

Graziela Cleuza Vieira

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ULTRAESTRUTURAL
DOS HEMÓCITOS DA OSTRÁ PERLÍFERA *Pteria hirundo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Dra. Luciane Maria Perazzolo
Co-orientador: Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis/SC
2016

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.**

Vieira, Graziela Cleuza

Caracterização funcional e ultraestrutural dos hemócitos da ostra perlifera *Pteria hirundo* / Graziela Cleuza Vieira ; orientadora, Luciane Maria Perazzolo ; coorientador, Rafael Diego da Rosa. - Florianópolis, SC, 2016.

104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. imunidade de bivalves. 3. hemócitos. 4. caracterização funcional. 5. caracterização ultraestrutural. I. Perazzolo, Luciane Maria . II. Rosa, Rafael Diego da . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Caracterização funcional e ultraestrutural dos hemócitos da ostra
perlífera *Pteria hirundo***

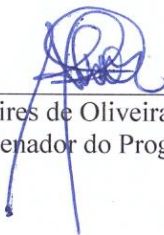
Por

GRAZIELA CLEUZA VIEIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

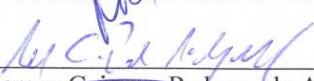
Banca Examinadora:



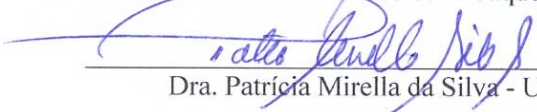
Dra. Luciane Maria Perazzolo – *Orientadora*



Dr. José Luiz Pedreira Mourão - UFSC



Dr. Marcos Cavano Pedroso de Albuquerque - UFSC



Dra. Patrícia Mirella da Silva - UFPB

Este trabalho é dedicado a minha
família (Manoel, Cleusa e Izabela) e ao
querido Giovane.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus orientadores: Dra Luciane Perazzolo e Dr Rafael Rosa por me aceitarem e pela grande oportunidade de fazer parte do LIAA. Além disso, sou eternamente grata pela confiança, conselhos, ensinamentos, amizade e momentos felizes E também os angustiantes que me fizeram refletir e crescer como profissional e ser humano. Agradeço imensamente pela dedicação de vocês comigo, e com o meu trabalho, além da paciência ímpar que possuíram ao me ensinar e orientar. Muitíssimo obrigada aos dois, levarei muito de vocês comigo.

À querida Dra Margherita pela disposição, dedicação e grande ajuda com as minhas intermináveis análises de MET. Obrigada por estar sempre presente no laboratório levando entusiasmo, sorrisos, conhecimento e carinho em forma de guloseimas.

Aos meus lindos e queridos amigos do LIAA pelo companheirismo, apoio, ajuda nos momentos difíceis, momentos felizes e muitos sorrisos e gargalhadas. Emily, Samuca, Jaque, Amandita, Fabio, Maroca, Cairézito, Gabriel, Anderson, Adri, Marcelo, Augusto, Marco, Nicolas, Bruno e Laís. Vocês são muito especiais e me ajudaram a superar muitas das minhas dificuldades, foi muito especial conhecer cada um de vocês. Obrigada querido Augusto pela parceria, grande ajuda e responsabilidade com o nosso trabalho.

Ao Dr. Marcos Albuquerque Caivano por todo apoio ao longo desses dois anos e pelo fornecimento das ostras perliíferas para a realização deste trabalho.

Muito obrigada Dra Patrícia Mirella pela valiosa ajuda com a citometria de fluxo e por toda a atenção e disposição em sanar minhas dúvidas em relação a essa técnica que contribuiu e acrescentou muito em meu trabalho. Obrigada Éder e Professora Zenilda por todo o apoio com a preparação das amostras para a microscopia eletrônica. Obrigada a Emily e Chirle (LAMEB) e Suzane e Eliane (LCME) por toda a ajuda e conhecimento passado ao longo destes dois anos no que se refere a microscopia de luz e eletrônica.

Sou grata à CAPES pelo fornecimento da bolsa, a UFSC pela infraestrutura e a Pós-graduação em Aquicultura pela oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço a minha família, que é o meu porto seguro, por todo o apoio ao longo da minha vida. Aos meus pais por toda dedicação a mim e apoio nas minhas escolhas. Obrigada a querida Izabela, que é irmã, amiga, parceira e cúmplice por todo o companheirismo, inclusive em

todos os dias que me acompanhou até a BU para terminar de escrever a dissertação. Agradeço pela paciência e valiosa ajuda com todas as pranchas de fotos que estão presentes nesse trabalho. Obrigada ao Giovane Eidt por toda a paciência, parceria, conselhos, amor, bem querer e motivação a me tornar uma profissional e pessoa melhor.

Obrigada Leila e Simone pelos sorrisos matinais e por manter nosso ambiente sempre limpo e organizado, o que sempre trouxe certo acolhimento, já que passamos mais tempo na UFSC do que em casa. Obrigada Anselmo pela gentileza em sempre nos auxiliar em todos os assuntos, principalmente no esclarecimento de algumas dúvidas relacionadas ao funcionamento da UFSC. Ao povo dos laboratórios vizinhos pelas reuniões na cozinha sempre regadas a tortas deliciosas, muitas risadas, companheirismo e novas valiosas amizades.

Aos meus amigos verdadeiros que permanecem em minha vida ano após ano participando e vibrando a cada conquista minha.

Ao Rafael Alves, querido Buda (*in memoriam*), por deixar seu lindo legado a respeito dos estudos da biologia de *Pteria hirundo*, o qual me auxiliou na compreensão de alguns aspectos fisiológicos e morfológicos desta espécie.

Obrigada ao universo por me permitir viver todas as ricas experiências ao longo destes dois anos.

“Sabedoria é ter ouvidos para o diferente, acolhendo
o aprendizado em harmonia com a nossa essência.”
Elis Busanello

RESUMO

A ostra perlífera *Pteria hirundo* possui um grande potencial para a aquicultura nacional, pois além de apresentar potencialidade para o consumo, essa espécie possui a capacidade de produzir pérolas. Apesar do seu potencial para cultivo, pouco ainda se conhece a respeito da sua fisiologia e sistema imune. O presente estudo teve por objetivo identificar e caracterizar morfológica e ultraestruturalmente os hemócitos de *P. hirundo*, bem como identificar as populações hemocitárias e avaliar algumas respostas celulares e humorais de defesa frente a uma infecção bacteriana. Três populações de hemócitos foram encontradas: hemócitos hialinos (HH), hemócitos granulares (HG) e células blásticas (CB). A população mais abundante na circulação foi a de HH (88,2%), que se caracterizaram pela presença de poucos a nenhum grânulo em seu citoplasma, seguida pelos HG (9,4%) com muitos grânulos grandes e elétron-lúcidos no citosol, e as CB (2,4%) que foram os menores hemócitos e se caracterizaram por possuir forma esférica e uma alta razão núcleo-citoplasma. Três diferentes subpopulações de HH foram identificadas (HH-1, HH-2 e HH-3), apresentando diferenças quanto ao tamanho celular e à complexidade interna. Os hemócitos apresentaram uma elevada capacidade fagocítica *ex vivo* de partículas inertes (38,5% dos hemócitos avaliados). Além disso, essas células mostraram-se aptas a produzir moléculas microbidasas como as espécies reativas de oxigênio (ERO), porém esta produção não foi induzida por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. Os principais produtores deste composto microbidaasa foram os HH-1, HG e HH-3. A presença de moléculas aglutinantes na hemolinfa de ostras previamente desafiadas com a *Vibrio alginolyticus* foi demonstrada por meio da aglutinação *in vitro* de bactérias marinhas *Vibrio harveyi* e *V. alginolyticus* (título aglutinante 256× e 1024×, respectivamente). Contudo, as bactérias marinhas Gram-positivas, *Mycobacterium maritropicum* e *Corynebacterium stationis* não foram aglutinadas. O número total de hemócitos circulantes (THC) nas ostras sadias foi de $8,53 \pm 4,27 \times 10^6$ células/mL, no entanto 24 h após infecção com *V. alginolyticus* (ou injeção com salina), o hemograma caiu pela metade. A caracterização ultraestrutural e funcional dos hemócitos de *P. hirundo* abre perspectivas para estudos visando à prevenção e ao controle de enfermidades em pterídeos com interesse aquícola.

Palavras-chave: Aquicultura, imunidade de bivalves, hemócitos, caracterização funcional, caracterização ultraestrutural.

ABSTRACT

The pearl oyster *Pteria hirundo* (Pteridae family) has a great potential in national aquaculture due to its gastronomic appeal and to its capacity to produce pearls. Despite of its economic importance, little is known about its physiology and immune system. Thus, the aim of the present study was to identify and characterize at morphological and ultrastructural levels the hemocytes of *P. hirundo*, as well to identify its hemocyte populations and evaluate some cellular and humoral defenses in response to a bacterial infection. Three main hemocyte populations were recognized, represented by hyaline hemocytes (HH), granular hemocytes (GH) and blast cells (BC). The most abundant population comprised the hyaline hemocytes (88.2%) which were characterized by the presence few or no granules in the cytoplasm, followed by the granular hemocytes (9.4%) which have a great number of large electron lucid granules, and blast cells (2.4%) which were the smallest hemocytes, showing a spherical format and a high nucleus/cytoplasm ratio. Three different subpopulations of HH were identified (HH-1, HH-2 and HH-3), showing differences in terms of cellular volume and internal complexity. The hemocytes showed an elevated phagocytic capacity *ex-vivo* for inert particles (38.5% of the evaluated hemocytes). Besides, these cells are able to produce microbicidal molecules, such as reactive oxygen species (ROS), but the production of these molecules were not induced by bacterial lipopolysaccharides (LPS). The main ROS-producing cells were the HH-1, GH and HH-3. The presence of agglutinating molecules in the hemolymph of pearl oysters pre-challenged with the Gram-negative *Vibrio alginolyticus* was demonstrated by the *in vitro* agglutination of marine *Vibrio* species, *V. harveyi* and *V. alginolyticus* (agglutinating title of 256× and 1024×, respectively). However, the marine Gram-positive bacteria *Mycobacterium maritypicum* and *Corynebacterium stationis* were not agglutinated by the oyster hemolymph. The total count of circulating hemocytes in apparently healthy animals was $8.53 \pm 4.27 \times 10^6$ cells/mL, but after an experimental injection of a bacterial solution (*V. alginolyticus*) or saline, the number of hemocytes significantly dropped (2×). In conclusion, the hemolymph of *P. hirundo* contains the typical hemocyte types found in bivalves and the ultrastructural and functional characterization of these cells represents a pioneering study that opens new perspectives for a better understanding of the immune reactions of this pearl oyster, aiming the prevention and control of infectious diseases in pteridean species of aquaculture importance.

Keywords: Aquaculture, bivalve immunity, hemocytes, functional characterization, ultrastructural characterization.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1:	Produção de moluscos bivalves em Santa Catarina.....	21
Figura 2:	A ostra perlífera <i>Pteria hirundo</i>	23
Figura 3:	Micrografias dos diferentes tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa da ostra <i>Crassostrea gigas</i>	30
Figura 4:	Representação esquemática das principais funções hemocitárias em ostras <i>Crassostrea gigas</i>	34
Figura 5:	Esquema das etapas metodológicas utilizadas neste estudo para a caracterização morfo-funcional dos hemócitos da ostra perlífera <i>Pteria hirundo</i>	39

ARTIGO

Figura 1:	Fotos de microscopia de luz dos diferentes tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de ostras perlíferas <i>Pteria hirundo</i>	56
Figura 2:	Micrografias dos diferentes tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa da ostra <i>Pteria hirundo</i>	58
Figura 3:	Citograma representativo da morfologia dos hemócitos de <i>Pteria hirundo</i> , considerando o volume celular (FSC - <i>Forward Scatter</i>) versus a complexidade interna celular (SSC - <i>Side Scatter</i>)	60
Figura 4:	Fagocitose de partículas fluorescentes de látex pelos hemócitos de <i>Pteria hirundo</i>	62
Figura 5:	Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos hemócitos da ostra <i>Pteria hirundo</i>	62
Figura 6:	Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por cada uma das populações hemocitárias da ostra <i>Pteria hirundo</i>	63
Figura 7:	Contagem de hemócitos totais (THC) de <i>Pteria hirundo</i> ...	64
Figura 8:	Título aglutinante da hemolinfa total de <i>Pteria hirundo</i> contra bactérias marinhas Gram-negativas	66
Figura 9:	Número de hemócitos circulantes na hemolinfa de diferentes espécies de moluscos	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

× <i>g</i>	força gravitacional
ATCC	(<i>American type culture collection</i>)
ATO	coloração azul de toluidina
CB	células blásticas
CFU	unidade formadora de colônia
CPI	(<i>conventional phenotypic identification</i>)
DCFH	2' 7' diclorofluoresceína
DCFH-DA	2' 7' diacetato de diclorofluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade óptica
DScam	(<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i>) molécula de adesão celular Síndrome de Down
dsRNA	(<i>double - stranded RNA</i>) dupla fita de RNA
DUOX	dupla oxidase
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	espécies reativas de oxigênio
ETs	(<i>Extracellular traps</i>) armadilhas extracelulares
FREPs	(<i>Fibrinogen- relatated proteins</i>) proteínas relacionadas ao fibrinogênio
FSC	(<i>forward scatter</i>) dispersão frontal
G	unidade Gauge
HG	hemócitos granulares
HH	hemócitos hialinos
HH-1	hemócito hialino tipo 1
HH-2	hemócito hialino tipo 2
HH-3	hemócito hialino tipo 3
LB	meio <i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MAS	(<i>Modified Alsever Solution</i>) solução de Alsever modificada
MET	microscopia eletrônica de transmissão
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<i>naïve</i>	natural – sem infecção ou injúria
PAM	peptídeo antimicrobiano
PAMP	(<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>) padrões moleculares associados a patógenos
PBS	tampão fosfato salina (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)

PBS-salina	PBS Laborclin® acrescido de 2,1% NaCl
PGRP	(<i>peptidoglycan recognition protein</i>) proteínas de reconhecimento de peptidoglicana
pH	potencial de hidrogênio
Pool	conjunto de amostras
PRP	proteína de reconhecimento padrão
RNA	(<i>ribonucleic acid</i>) ácido reibonucleico
SOD	superóxido dismutase
SSC	(<i>side Scatter</i>) dispersão lateral
TBS-lectina	(<i>tris buffer solution</i>) tampão tris salina
TEPs	(<i>thioester containing proteins</i>)
THC	contagem total de hemócitos
U.A.	unidade arbitrária
βGBP	(<i>β 1,3 glucan binding protein</i>) proteínas de reconhecimento de β 1,3 glicanas
λ	comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	21
1.1.1 A ostra perlífera <i>Pteria hirundo</i>	22
1.1.2 As principais enfermidades que acometem os moluscos bivalves	24
1.1.3 Considerações sobre o sistema imune dos moluscos bivalves .	27
1.1.4 Hemócitos de bivalves: características morfológicas e ultraestruturais	29
1.1.5 Fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	32
1.6 Proteínas de Reconhecimento-Padrão do tipo Aglutininas ou Lectinas.....	36
1.2 HIPÓTISES	38
1.3 OBJETIVOS	38
1.4 ETAPAS METODOLÓGICAS.....	39
2. ARTIGO CIENTIFICO.....	41
ABSTRACT	43
RESUMO	45
2.1. INTRODUÇÃO	47
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.2.1. Animais	49
2.2.2. Coleta de hemolinfa.....	50
2.2.3. Hemograma:contagem total de hmócitos (THC)	51
2.2.4. Infecção bacteriana experimental	51
2.2.5. Análises ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	51
2.2.6. Coloração dos hemócitos com Giemsa	52
2.2.7. Análises em citometria de fluxo	52
2.2.7.1. Identificação das populações hemocitárias	53
2.2.7.2. Capacidade fagocítica <i>ex-vivo</i> dos hemócitos	53
2.2.7.3. Produção <i>ex-vivo</i> de espécies reativas de oxigênio (ERO)	53
2.2.8. Capacidade aglutinante de hemolinfa	54

2.2.9.	Análises estatísticas.....	55
2.3	RESULTADOS	55
2.3.1.	Caracterização morfológica e ultraestrutural dos hemócitos	55
2.3.2.	Identificação das populações e subpopulações hemocitárias.	59
2.3.3.	Caracterização funcional dos hemócitos.....	61
2.3.3.1.	Determinação da capacidade fagocítica ex-vivo.....	61
2.3.3.2.	Produção <i>ex-vivo</i> de espécies reativas de oxigenio (ERO)	62
2.3.3.3.	Hemograma de ostras submetidas a um desafio bacteriano	64
2.3.3.4.	Avaliação da capacidade aglutinante do plasma após desafio bacteriano	65
2.4	DISCUSSÃO	66
2.5	CONCLUSÕES	75
2.6	AGRADECIMENTOS	75
2.7	REFERÊNCIAS	75
3.	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	85

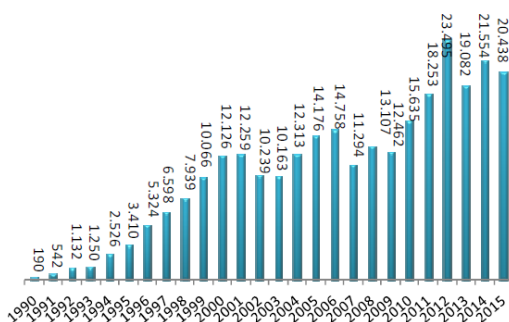
1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A aquicultura mundial vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. A produção aquícola desempenha um papel socioeconômico de grande relevância à sociedade, por meio da produção alimentícia e geração de empregos e renda. Em 2014, a produção mundial de pescados alcançou um volume total de 167,2 milhões de toneladas, movimentando aproximadamente 160,2 bilhões de dólares (FAO, 2016). O Brasil está entre os quinze maiores países produtores de pescados do mundo, alcançando em 2014 um volume total de produção de 767.026 toneladas (FAO, 2016). A maricultura nacional baseia-se principalmente na produção de crustáceos (carcinicultura) e de moluscos bivalves (malacocultura) (ACEB, 2014).

A malacocultura brasileira, no ano 2013, gerou um volume total de produção de 19.359 toneladas representando um valor de 58 milhões de Reais (IBGE, 2013). Alguns estados, ao longo da costa brasileira, têm implementado o cultivo de moluscos bivalves, sendo que o Estado de Santa Catarina se destaca como o principal produtor de moluscos, como responsável por mais de 97% da produção nacional. Em 2015, a produção catarinense total de moluscos bivalves foi de 20.438 toneladas (**Figura 1**) (EPAGRI, 2016), envolvendo 572 maricultores e estabelecendo, deste modo, uma importante fonte de renda para o estado, gerando empregos e proporcionando uma movimentação financeira bruta de mais de 78 milhões de Reais (EPAGRI, 2016).

Figura 1: Produção de moluscos em Santa Catarina.



Evolução da produção de moluscos bivalves comercializados em Santa Catarina entre 1990 e 2015 (valores expressos em toneladas). Fonte: EPAGRI, 2016.

Apesar da ampla diversidade de moluscos marinhos encontrados no Brasil, o cultivo desses animais restringe-se basicamente às espécies comestíveis, como a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (espécie exótica), o mexilhão nativo *Perna perna* e a vieira nativa *Nodipecten nodosus*. No entanto, outras espécies podem ainda apresentar, potencialmente, um valor comercial significativo além de servirem ao consumo humano, como é o caso dos bivalves que produzem pérolas. Neste contexto, destacam-se os moluscos da família Pteriidae, que além de seu potencial gastronômico, possuem ainda a capacidade de produzir pérolas, o que aumenta o seu interesse para a maricultura (URBAN, 2000).

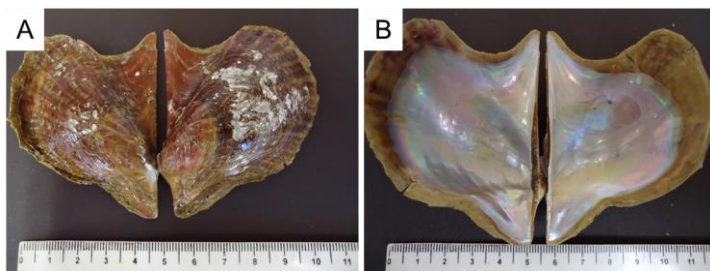
As ostras perlíferas da família Pteriidae são representadas principalmente por dois gêneros: *Pteria* e *Pinctada*. Esses bivalves possuem um grande valor econômico, devido a sua capacidade de produzir pérolas, o que já foi demonstrado em outros países. Segundo Fassler (1995), os maiores produtores de pérolas se localizam no Sul do Pacífico e Sudeste da Ásia, destacando-se o Japão e a China. Entre as espécies mais cultivadas no mundo estão a *Pinctada maxima*, *Pinctada margaritifera*, *Pinctada martensi*, *Pteria penguin* e *Pteria sterna* (GÓMEZ-ROBLES et al., 2013; KY et al., 2015; NAGAI, 2013; WASSNIG; SOUTHGATE, 2012).

No litoral brasileiro foram identificadas, até o momento, duas espécies da família Pteriidae: *Pinctada imbricata* e *Pteria hirundo*. Considerando o desenvolvimento da maricultura em Santa Catarina e a busca por novas espécies para o cultivo, essas duas espécies de ostras perlíferas destacam-se como uma interessante opção ao cultivo devido a sua particularidade em produzir pérolas (ALBUQUERQUE et al., 2012).

1.1.1 A ostra perlífera *Pteria hirundo*

No Brasil a ostra perlífera com maior potencial para cultivo é a espécie *Pteria hirundo* (**Figura 2**), conhecida como a ostra alada do Atlântico (“*Atlantic Wing Oyster*”) ou laripeba (ALBUQUERQUE et al., 2012). Essa espécie é nativa do Oceano Atlântico, ocorrendo desde a América do Norte até o Brasil, incluindo ainda o Oceano Índico no oeste da Índia e habitando profundidades que variam de 20 a 150 m. Outras sinônimas encontradas para essa espécie são *P. colymbus* e *P. atlantica* (ABBOT, 1974; RIOS, 2009).

Figura 2: A ostra perlífera *Pteria hirundo*.



Vista (A) externa e (B) interna das valvas de um espécime cultivado em Sambaqui, Florianópolis/SC, Brasil.

Apesar de não ser uma característica exclusiva dos pterídeos, a ocorrência de pérolas nessas espécies é bastante frequente. A formação de pérolas ocorre em resposta a fatores externos estressores, tais como resíduos ou grãos de areia que adentram sua concha. A pérola é uma concreção densa e brilhante, que consiste em uma pequena partícula rodeada por camadas concêntricas de nácar, composta por conchiolina ($C_{32}H_{48}N_9O_{11}$), carbonato de cálcio na forma de aragonita ($CaCO_3$) e água (NAGAI, 2013). Em geral, dois tipos de pérolas podem ser formados pelas diferentes espécies de ostras: (i) *pérola ampolada*, também chamada meia-pérola, que é uma protrusão da superfície interna da concha da ostra e, (ii) *pérola encistada*, que se forma ao redor do núcleo redondo (geralmente de madrepérola), que é introduzido cirurgicamente na gônada do molusco (NAGAI, 2013). Espécies do gênero *Pteria*, como *P. hirundo*, possuem a capacidade de produzir pérolas do tipo ampolada. Além de produzir pérolas, a carne de *P. hirundo* é muito apreciada para consumo humano, o que faz aumentar ainda mais o seu interesse para a aquicultura (ALBUQUERQUE, 2010).

A maior limitação para o desenvolvimento mundial da indústria do cultivo de pérolas é a disponibilidade limitada de adultos e sementes selvagens (GERVIS; SIMS, 1992). A ostra perlífera *P. hirundo* apresenta dificuldades em ser cultivada devido à baixa densidade e frequência irregular de fixação de sementes nos cultivos de moluscos (ALBUQUERQUE, 2010). Visando o cultivo de *P. hirundo*, o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), pertencente ao Departamento de Aquicultura da UFSC, optou estudar a viabilidade de produção em condições de laboratório, visto que somente a produção

artificial de sementes desta espécie poderia tornar-se uma opção para cultivo desta espécie em Santa Catarina (ALBUQUERQUE, 2010).

Resultados oriundos de estudos de pesquisadores do LMM demonstraram que indivíduos da espécie *P. hirundo* são resistentes às práticas de manejo. As larvas apresentaram taxas de crescimento e sobrevivência semelhantes a outras espécies de ostras perlíferas e moluscos explorados comercialmente pela aquicultura (ALBUQUERQUE et al., 2012). As sementes de *P. hirundo*, durante a etapa de cultivo intermediário, que é a fase mais crítica do cultivo de moluscos bivalves, apresentaram sobrevivência e crescimento semelhantes a outras espécies de ostras perlíferas, tradicionalmente utilizadas na indústria de pérolas em diversos países (ALBUQUERQUE et al., 2012). Os resultados obtidos através de trabalhos realizados no LMM confirmam a potencialidade zootécnica desta espécie em tornar-se uma nova opção para o cultivo na maricultura catarinense. Apesar do grande potencial comercial das ostras perlíferas, atualmente não há relatos de cultivo comercial de nenhum outro pterídeo no Brasil.

1.1.2 Principais enfermidades que acometem os moluscos bivalves

Os bivalves marinhos são um grupo animal filogeneticamente antigo e bem sucedido, capaz de sobreviver em equilíbrio em ambientes aquáticos ricos em microrganismos variados, incluindo protozoários, bactérias, fungos e vírus; (ALLAM; RAFTOS, 2015; BARRACO; SILVA, 2008). Estima-se que um litro de água marinha costeira possua milhões de células de algas, bilhões de bactérias e outros microrganismos eucariontes, e até 10 bilhões de partículas virais (BREITBART, 2012; PEDRO, 2006; SUTTLE, 2007; AMEND et al., 2012). Alguns desses microrganismos estabelecem relações comensais com os moluscos, outros fazem parte da sua microbiota trazendo-lhes benefícios fisiológicos e outros, ainda, podem ser nocivos provocando infecções e ameaçando sua sobrevivência (BACHÈRE et al., 2015). Uma vasta variedade de microrganismos podem causar doenças em bivalves, como os vírus, bactérias, protozoários e metazoários, podendo levar a mortalidades severas nos cultivos (BARBOSA SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015a).

A importância econômica e a crescente produção de moluscos bivalves no mundo têm requerido um maior cuidado no manejo e atenção dos pesquisadores em relação às doenças infecciosas que acometem esses animais nos cultivos (ALLAM; RAFTOS, 2015). A produção e o comércio de espécies de bivalves marinhos são vulneráveis às condições

ambientais e a surtos de doenças (BARBOSA SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015b) que podem afetar todos os estágios no processo de produção dos moluscos: larvas e pós-larvas em laboratórios, bem como juvenis e adultos cultivados em mar aberto ou baías (BARBOSA SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015b).

Atualmente, existem oito doenças infecciosas que afetam os moluscos que são listadas Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sendo a sua ocorrência de notificação obrigatória. Dentre elas, estão duas infecções virais, uma infecção bacteriana e cinco infecções causadas por protozoários. Seis destas oito doenças infecciosas, que afetam os moluscos, causam impactos nos cultivos de bivalves (ALLAM; RAFTOS, 2015). Por outro lado, houve um crescente interesse nos últimos anos em se conhecer de maneira mais aprofundada os mecanismos de defesa utilizados pelos bivalves para combater e resistir aos agentes infecciosos (BACHÈRE et al., 2004; SONG et al., 2010; BAYNE, 1983; CHENG, 1981; CHU, 1988), o que representa um avanço científico na área de imunologia de moluscos.

Trabalhos recentes relatam a presença de um vírus do tipo herpes, denominado Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1), que tem sido considerado um dos principais patógenos de moluscos (EFSA AHAW PANEL, 2015). O OsHV-1 foi detectado em cultivos da ostra *C. gigas* na França, Irlanda, Inglaterra, Espanha, Itália, Holanda, Portugal, Noruega, Nova Zelândia, Coreia do Sul, Japão, China, México e Estados Unidos (EFSA AHAW PANEL, 2015). De modo geral, infecções causadas pelo OsHV-1 estão associadas principalmente a grandes taxas de mortalidades em sementes e juvenis de ostras, contudo, em animais adultos a proporção de mortalidade é menor (EFSA AHAW PANEL, 2015). Esse vírus também é capaz de infectar e causar mortalidades menos intensas em outros bivalves, como vieiras, mexilhões e berbigões (EFSA AHAW PANEL, 2015; MARTENOT et al., 2015).

Além dos vírus, espécies de protozoários do gênero *Perkinsus* spp. têm historicamente ameaçado os cultivos de moluscos em todo o mundo, responsável pela enfermidade Perkinsiose, causando mortalidades massivas em muitas espécies de bivalves de águas tropicais e subtropicais em todo o mundo (VILLALBA et al., 2011). Entre as espécies mais impactantes estão *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni*, ambas sendo de notificação obrigatória. A espécie *P. marinus* é responsável por mortalidades massivas nas espécies *Crassostrea virginica* nos Estados Unidos e no México (BURRESON; RAGONE-CALVO, 1996; GULLIAN-KLANIAN et al., 2008) e *C. gigas* no México (ENRÍQUEZ-ESPINOZA et al., 2010).

A espécie *P. olseni* tem sido comumente relatada nas espécies de berbigões *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* em países europeus como França, Espanha, Itália e Portugal, além da Ásia e Austrália (CHOI; PARK, 2010; VILLALBA et al., 2011; SOUDANT; E CHU; VOLETY, 2013).

No Brasil, o primeiro relato do gênero *Perkinsus* ocorreu no Ceará, na espécie *C. rizophorae* (SILVA et al., 2009) e foi identificada como *P. beihaiensis* (SABRY et al., 2013). Hoje se sabe que *P. beihaiensis* afeta as espécies *C. rizophorae*, *C. gasar* e *Anomalocardia brasiliana* nos estados do Ceará, Bahia, Piauí, Maranhão e Santa Catarina (SABRY et al., 2013; SILVA et al., 2013; SILVA et al. 2014; BRANDÃO et al., 2013; PINHO et al., 2015; LUZ et al., 2016; DANTAS-NETTO et al., 2015; QUEIROGA et al., 2015). No entanto recentemente *P. marinus* foi detectado nas espécies *C. rizophorae* e *C. gasar* no estado da Paraíba (SILVA et al., 2013, QUEIROGA et al., 2015) e Ceará na espécie *C. rizophorae* (DANTAS-NETO et al., 2015).

Além de vírus e protozoários que danificam a saúde dos moluscos bivalves, muitas bactérias patogênicas causam grandes perdas tanto em cultivos quanto em ambientes naturais (TRAVERS et al., 2015a). Entre as bactérias potencialmente patogênicas para bivalves, destacam-se as do gênero *Vibrio spp.* que são considerados importantes patógenos na aquicultura (TRAVERS et al., 2015b). O gênero *Vibrio* compreende muitas espécies patogênicas para humanos e para organismos aquáticos, incluindo peixes, corais e bivalves (LE ROUX et al., 2015). Os víbrios são bactérias Gram-negativas, baciliformes e que se movimentam a partir de um único flagelo polar (SAWABE et al., 2013). Dentre as espécies de víbrios marinhos que causam doenças na aquicultura destacam-se as espécies *Vibrio alginolitycus* e *Vibrio harveyi* (TRAVERS et al., 2015b), sendo que ambas têm sido responsáveis por surtos de mortalidade em todo o mundo envolvendo peixes e moluscos (THOMPSON et al., 2004; SAULNIER et al., 2010; RUWANDEEPIKA et al., 2012).

A bactéria *V. alginolitycus* foi associada a mortalidades em ostras da espécie *Saccostrea glomerata* (GREEN; BARNES, 2009), berbigões da espécie *Venerupis decussatus* (TRAVERS et al., 2015a) e abalones da espécie *Haliotis diversicolor* (CAI et al., 2006). Por outro lado, diferentes moluscos podem ser afetados por *V. harveyi* incluindo a ostra perlífera *P. máxima* (PASS; DYBDAHL; MANNION, 1987), a ostra gigante *Tridacna gigas* (SUTTON; GARRICK, 1993) e o abalone *Haliotis tuberculata* (NICOLAS et al., 2002).

1.1.3 Considerações sobre o sistema imune dos bivalves

Como os demais invertebrados, os moluscos contam com eficientes barreiras externas e mecanismos internos de defesa para combater e controlar infecções (BARRACCO; DA SILVA, 2008; SCHMITT et al., 2011). Os moluscos bivalves precisam filtrar diariamente grandes volumes de água para a sua respiração e nutrição. Em consequência disso, esses animais estão constantemente expostos a uma grande variedade de microrganismos, incluindo muitas espécies patogênicas. A primeira linha de defesa nesses animais é conferida pela concha que serve de barreira física (BARRACCO; DA SILVA, 2008). A segunda barreira física é conferida pelo tecido epitelial e pelo muco que o recobre e que aprisiona os microrganismos, facilitando assim a sua eliminação graças à atividade ciliar (ALLAM; RAFTOS, 2015). Quando essas barreiras são transpostas pelos microrganismos, diferentes reações imunológicas são desencadeadas com o objetivo de matar e eliminar os agentes invasores. A defesa interna, por sua vez, é assegurada pelos imuno-efetores que compõe a sua imunidade inata (VARGAS-ALBORES; BARRACO, 2001)

Os moluscos bivalves possuem um sistema circulatório semiaberto onde o líquido circulante, denominado hemolinfa, circula entre os vasos e seios bem como em todos os tecidos moles (ALLAM; RAFTOS, 2015). A hemolinfa é composta por uma fração celular representada pelas células circulantes ou hemócitos, que são os principais efetores imunocelulares, e uma fração líquida constituída pelo plasma que contém inúmeras moléculas, muitas das quais participam das respostas imune-humorais (BARRACCO; DA SILVA, 2008)

Os moluscos bivalves possuem apenas um sistema imunológico do tipo inato, não possuindo uma imunidade do tipo adaptativa como ocorre nos vertebrados. Assim, esses animais são desprovidos de linhagens clonais de células linfocíticas, as quais são responsáveis pela produção de anticorpos que lhes confere uma memória imunológica a longo prazo. Apesar da ausência de respostas adaptativas clássicas de defesa, o sistema imunológico dos moluscos é altamente complexo e envolve tanto reações dos próprios organismos quanto das comunidades microbianas endobiontes a eles associadas (*vide* revisão de SCHMITT et al., 2012).

As respostas de defesa contra microrganismos compreendem a ação sinérgica entre as reações celulares, desempenhadas pelos hemócitos, e as reações humorais, onde atuam moléculas imuno-efetoras dissolvidas no plasma (BARRACCO; DA SILVA, 2008). Os invasores são detectados via humoral e receptores da superfície dos hemócitos,

desencadeando assim a produção de citocinas que medeiam o recrutamento adicional de hemócitos que realizam a fagocitose e que produzem e/ou liberam uma vasta gama de moléculas antimicrobianas (ALLAM; RAFTOS, 2015).

As proteínas e peptídeos antimicrobianos (PAM) são componentes essenciais do sistema imune inato e estão amplamente distribuídos entre os diferentes Reinos dos seres vivos. Essas moléculas podem apresentar uma atividade microbicida rápida e potente contra um extenso espectro de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e muitos vírus (GUANÍ-GUERRA et al., 2010). Os PAM são classicamente descritos como moléculas anfipáticas e de baixo peso molecular (<10 kDa). Sua característica anfipática (uma região catiônica e uma região hidrofóbica) facilita a sua interação e inserção nos fosfolipídeos aniônicos presentes na membrana externa dos microrganismos (ROSA; BARRACCO, 2010; YOUNT et al., 2006). Ao interagirem com a membrana, os PAM podem nela se inserir, formando grandes poros por onde há extravasamento do conteúdo citoplasmático bacteriano. Além disso, os PAM podem ainda apresentar uma atividade detergente ou ainda interferir em diferentes vias metabólicas, causando a morte do microrganismo (GUANÍ-GUERRA et al., 2010). As famílias de PAM mais bem descritas e caracterizadas em moluscos bivalves são as encontradas na ostra *C. gigas* (BACHÈRE et al., 2015) e no mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (MITTA, 2000).

As respostas celulares compreendem especialmente a fagocitose de microrganismos e encapsulamento de parasitas de grande tamanho (VARGAS-ALBORES; BARRACO, 2001). Os fatores humorais abrangem uma variedade de proteínas de reconhecimento, capazes de reconhecer padrões moleculares específicos presentes na superfície dos microrganismos/patógenos (PRP: *pattern recognition proteins* e M/PAMP: *microbe/pathogen-associated molecular patterns*) e uma série de moléculas imunoefetoras que levam à neutralização ou destruição dos patógenos invasores (ENGELMANN; COOPER; NÉMETH, 2005; MUTA, 2006). As células circulantes da hemolinfa, em conjunto com os fatores humorais do plasma, garantem a integridade corpórea e a sobrevivência dos moluscos, através da prevenção e controle das infecções.

Entre os principais mecanismos de defesa reconhecidos atualmente em moluscos bivalves estão: (i) o reconhecimento do não-próprio (via receptores plasmáticos ou celulares) e sinalização dos hemócitos (cascatas intracelulares de sinalização celular e secreção de citocinas); (ii) reações celulares de defesa (fagocitose, infiltração e formação de cápsulas

e armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos) e (iii) a produção de moléculas citotóxicas e antimicrobianas, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), as lisozimas e os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (SCHMITT et al., 2012b).

1.1.4 Hemócitos de bivalves: características morfológicas e ultraestruturais

Os hemócitos são as células imunocompetentes dos moluscos e também se caracterizam por serem os “fagócitos profissionais”, os quais são capazes de endocitar uma série de partículas estranhas e de produzir uma grande quantidade de efetores imunológicos (SCHMITT et al., 2012b). Os hemócitos desempenham um papel importante na fagocitose de microrganismos invasores, assim como na encapsulação de invasores maiores, como os parasitas, estando também envolvidos na cicatrização de ferimentos, na digestão dos alimentos e transporte de nutrientes, na formação da concha e na produção e secreção de inúmeros fatores humorais (CHENG, 1981; CHENG, 1996). Considerando que o sistema circulatório dos moluscos bivalves é aberto ou semiaberto, os hemócitos não se limitam as artérias e vasos sanguíneos, mas comumente se infiltram em outros tecidos onde podem aderir-se (BACHÈRE et al., 2004). Assim, os hemócitos infiltrados estão presentes em todas as cavidades, tecidos e epitélios de corpo dos bivalves, onde podem também apresentar funções de defesa (BACHÈRE et al., 2015).

Em relação à produção de hemócitos em moluscos, muito pouco é ainda conhecido, porém, sabe-se que de maneira geral, que os locais onde ocorrem a hematopoiese variam muito. No caso de cefalópodes e gastrópodes (*Biomphalaria glabrata*), um hipotético órgão hematopoiético, denominado de “órgão produtor de amebócitos”, foi identificado apenas em algumas espécies (LIE; HEYNEMAN; LIM, 1975; KINOTI, 1971; RACHFORD, 1976; SULLIVAN, 1988; OTTAVIANI, 2006; ACCORSI et al., 2014). Em muitos gastrópodes, a produção de hemócitos ocorre na região do pericárdio (LIE; HEYNEMAN; LIM, 1975) e nos cefalópodes, acredita-se que os hemócitos originam-se do corpo branco, que é o órgão que envolve o feixe óptico (CASTILLO; SALAZAR; JOFFE, 2015). No caso dos bivalves, algumas evidências sugerem que os hemócitos podem ser produzidos a partir de diferenciação de células do tecido conjuntivo (CHENG, 1996; SMOLOWITZ et al., 1989), além de serem produzidos nas células epiteliais das brânquias (JEMAÀ et al., 2014) e vasos sanguíneos ou células endoteliais arteriais (TIRAPÉ et al., 2007).

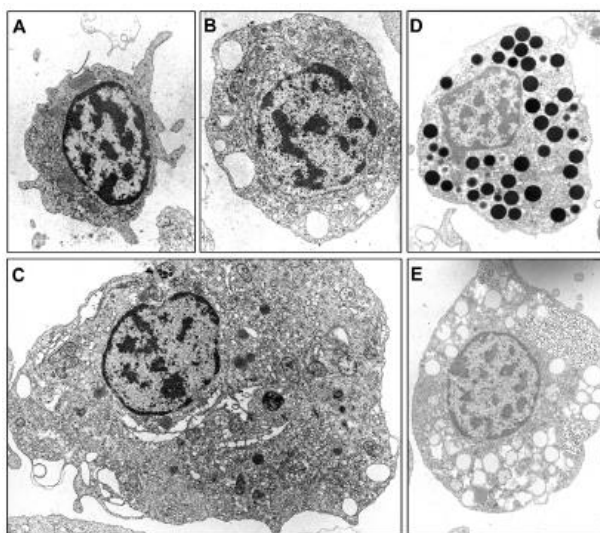
Os hemócitos dos moluscos são geralmente classificados com base em suas características morfológicas e na presença ou não de grânulos citoplasmáticos, o que acarreta em classificações controversas e falta de consistência entre diferentes estudos dentro de várias espécies de uma mesma família ou até mesmo dentro de uma única espécie (ALLAM; RAFTOS, 2015). De acordo com a classificação clássica de Cheng (1981) e Hine (1999), os hemócitos dos bivalves são subdivididos em duas grandes populações celulares: hemócitos granulares (ou granulócitos) e hemócitos hialinos (ou hialonócitos). Os *hemócitos granulares* (HG) apresentam tamanho variado, com grânulos citoplasmáticos de tamanhos variados e onde estão armazenados diferentes efetores do sistema imune (SCHMITT et al., 2012). Os *hemócitos hialinos* (HH), por sua vez, também apresentam tamanhos variados, com nenhum a poucos grânulos no citosol e são, normalmente, subdivididos em duas classes: (i) células indiferenciadas ou blásticas, com uma alta relação núcleo/citoplasma e (ii) células basófilas maiores, semelhantes a macrófagos (BARRACCO; DA SILVA, 2008). Além dos hemócitos granulares e hialinos, alguns moluscos apresentam ainda outro tipo denominado células serosas (células porosas/marrons ou *brown cells*) (HINE, 1999). As células serosas são particularmente comuns em moluscos que habitam águas marinhas poluídas (ZAROOGAN; YEVICH, 1993). Estas células podem estar envolvidas na excreção (HINE, 1999), desintoxicação de metais pesados (HASZPRUNAR, 1996) e na remoção de produtos de degradação de parasitas mortos ou de subprodutos metabólicos de parasitas como *Perkinsus* sp. (CIMA et al., 2000).

Os estudos a respeito das respostas imune celulares dependem amplamente da caracterização das células. Existem vários estudos a respeito da caracterização e classificação dos tipos hemocitários dos moluscos bivalves (HINE, 1999), para isso são utilizadas algumas técnicas que viabilizam estas análises. Entre as técnicas utilizadas para classificar e caracterizar os hemócitos de moluscos bivalves estão os corantes histológicos, as análises ultraestruturais e os ensaios de citometria de fluxo (HINE, 1999; HÉGARET et al., 2003a; WANG et al., 2012; REBELO et al., 2013).

As técnicas de coloração empregadas na caracterização de hemócitos são inúmeras e visam especialmente auxiliar na identificação de macromoléculas no citosol (carboidratos, lipídeos, proteínas) através, por exemplo, de seu caráter ácido-básico específico (WOOTTON; PIPE, 2003), além de contribuírem para uma melhor observação celular ao microscópio de luz. Os componentes subcelulares e as características ultraestruturais são facilmente observados com a utilização da

microscopia eletrônica de transmissão (MET), que auxilia muito na identificação dos tipos de hemócitos. Para ilustrar esse fato, *vide* a **Figura 3** que apresenta a ultraestrutura dos hemócitos de *C. gigas* (BACHÈRE et al., 2004). E, por fim, a técnica de citometria de fluxo vem sendo recentemente utilizada em estudos de caracterização das populações hemocitárias dos moluscos, bem como para avaliar a atividade fisiológica das células circulantes da hemolinfa (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003; HÉGARET et. al., 2003a).

Figura 3: Micrografias dos diferentes tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa da ostra *Crassostrea gigas*



Tipos de hemócitos circulantes na hemolinfa de *C. gigas*. Os hemócitos hialinos ou agranulares representam uma população heterogênea. (A) hemócito hialino pequeno, provavelmente uma célula jovem; (B) hemócito hialino basófilo; (C) Células hialinas grandes com citoplasma rico em sistemas de endomembranas; (D) hemócitos granulares com grânulos elétron-densos, e (E) hemócitos granulares com grânulos elétron-lúcidos e números corpos citoplasmáticos que são aparentemente corpos fagocíticos residuais. (Ampliação: 15.000×). Fonte: BACHÈRE et al., 2004.

Através do emprego de algumas técnicas foi possível classificar os hemócitos em algumas espécies de moluscos bivalves. Os hemócitos granulares e hialinos foram observados em algumas espécies de moluscos

bivalves como a *C. rhizophorae* (REBELO et al, 2013) e *C. gigas* (BACHÈRE et al, 1988), *Mytilus edulis* (MOORE; LOWE, 1977; PIPE, 1990a) e *M. galloprovincialis* (CARBALLAL et al. 1997a), *Perna viridis* (WANG et al, 2012); As células tipo-blásticas já foram descritas em alguns bivalves das famílias Ostreidae, Mytilidae, Dreissenidae, Veneridae, Cardiidae e Tridacnidae (*vide* a revisão de HINE, 1999). Estas células também foram descritas nas espécies de ostras *C. virginica*, *C. gigas*, *O. edulis* e *S. glomerata* (HINE, 1999; HÉGARET et al., 2003a; LAMBERT et al., 2003; DANG et al., 2012).

No que se refere aos Pteriídeos, os hemócitos de apenas duas espécies foram descritos até o momento. Na espécie *P. imbricata* foram identificados em sua hemolinfa, hemócitos hialinos, granulares e células serosas ou *brown cells* (KUCHEL et al., 2010), enquanto que na espécie *P. fucata* foram descritos hemócitos granulares e hemócitos hialinos grandes e pequenos (LI et al., 2015).

1.1.5 Fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os hemócitos desempenham um papel essencial na defesa de moluscos, sendo capazes de produzir respostas rápidas contra patógenos ou em tecidos danificados através da quimiotaxia e fagocitose (BACHÈRE et al., 2004; CHENG et al, 1981). Durante uma infecção, os hemócitos migram massivamente para os locais de injúria, onde realizam a fagocitose dos agentes invasores (**Figura 4**).

A fagocitose é um processo particularmente ativo em moluscos bivalves (SCHMITT et al., 2011) e extremamente importante, pois constitui a primeira linha de defesa celular para o controle da invasão dos microrganismos (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Este processo pode ser realizado por uma variedade de tipos de hemócitos, porém os granulares são geralmente os mais ativos em relação à fagocitose de partículas estranhas (KUCHEL et al., 2010).

Durante a fagocitose, o agente estranho é reconhecido, endocitado e interiorizado pelos hemócitos dentro de um fagossomo (BACHÈRE et al., 2015). Após a internalização de microrganismos, o fagossomo sofre maturação com a acidificação e fusão sequencial com compartimentos endossomal e lisossomal, incluindo ainda grânulos que contêm uma variedade de peptídeos/proteínas antimicrobianas (GUEGUEN et al., 2009; SCHMITT et. al., 2012). Dentro do fagossomo são lançados compostos microbicidas que levam à rápida neutralização/degradação dos microrganismos endocitados (BACHÈRE et al., 2015). Dentre as enzimas hidrolíticas presentes no fagossomo maduro estão as lisozimas que

desempenham um papel importante na destruição microbiana, devido às suas propriedades líticas contra as peptidoglicanas da parede bacteriana (HANCOCK; SCOTT, 2000). Apesar de não se saber ainda, é provável que algumas lisozimas e peptídeos antimicrobianos armazenados em grânulos citoplasmáticos dos hemócitos, sejam transportados ao fagossomo para matar os microrganismos ali presentes (BACHÈRE et al., 2015). Simultaneamente à fagocitose, os hemócitos produzem muitas espécies reativas de oxigênio (ERO) (BACHÈRE; HERVIO; MIALHE, 1991; LAMBERT et al., 2003).

A fagocitose está acompanhada pela produção de ERO que leva a um importante aumento no consumo de oxigênio em nível intracelular, conhecido como *burst* respiratório, e que resulta na produção de uma variedade de radicais livres altamente reativos de oxigênio, altamente citotóxicos e que auxiliam na destruição dos microrganismos (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Contudo, alguns microrganismos podem inibir ou resistir à morte intracelular, podendo assim iniciar uma infecção nas células epiteliais (ALLAN; RAFTOS, 2015). Este é tipicamente o caso para os membros da ordem Chlamydiales e Rickettsiales que infectam células epiteliais da mucosa ao longo diversos animais, incluindo os moluscos (FRYER; LANNAN 1994).

A produção de ERO está associada à ativação de um complexo enzimático localizado na membrana celular e na superfície dos grânulos lisossomais, denominado NADPH oxidase (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). A produção de ERO depende da enzima NADPH oxidase e da enzima transmembranar DUOX (Dupla oxidase), que foi evidenciada no genoma da ostra *C. gigas* (FLEURY et al, 2009). A expressão do gene DUOX em hemócitos foi associada a uma resposta bem sucedida das ostras contra víbrios virulentos (SUN; UGOLINI; VIVIER, 2014). A ativação da NADPH oxidase por componentes microbianos resulta na redução do oxigênio molecular a ânion superóxido (O_2^-). Este composto tóxico e microbicida pode dismutar-se espontaneamente através da enzima intracelular superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é um composto tóxico e se não for destruído pela catalase peroxissomal, pode difundir-se e chegar ao meio extracelular. O O_2^- pode também ser convertido em outros componentes citotóxicos como o radical hidroxila ($OH\cdot$) e em ânions hidroxila (OH^-) pela reação de Haber-Weiss ou, logo através da dismutação em H_2O_2 , em ácido hipocloroso ($HOCl$) e oxigênio singlet (1O_2) (ABELE; PUNTARULO, 2004; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). É importante ressaltar que a produção dessas moléculas, altamente citotóxicas e instáveis, possui um papel importante na destruição dos

patógenos invasores, no entanto podem também provocar graves danos aos tecidos do hospedeiro (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Para evitar o dano oxidativo em suas células, o hospedeiro conta com basicamente três mecanismos antioxidantes, sendo os dois primeiros endógenos que visam degradar/neutralizar as ERO através das enzimas SOD, catalases e a glutatona peroxidases (ABELE; PUNTARULO, 2004). O terceiro mecanismo compreende a ação de compostos antioxidantes de origem exógena, como o ácido ascórbico (vitamina C), a glutatona e o α -tocoferol (vitamina E), que podem interagir diretamente com os radicais livres, neutralizando-os igualmente (ABELE; PUNTARULO, 2004).

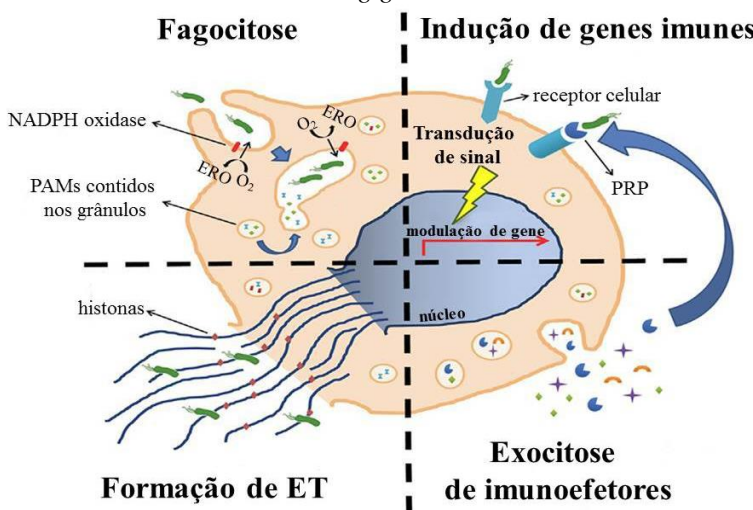
Em várias espécies de moluscos bivalves, a produção de ERO foi anteriormente demonstrada utilizando técnicas de citometria de fluxo ou quimioluminescência dependente de luminol nas ostras *C. virginica* (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003b; LARSON; ROBERSON; HETRICK, 1989), *C. gigas* (BACHÈRE; HERVIO; MIALHE, 1991; GOÏC et al., 2012) e *Ostrea edulis* (BACHÈRE; HERVIO; MIALHE, 1991), no berbigão *Mercenaria mercenaria* (BUGGÉ et al., 2007), nas vieras *Pecten maximus* (LE GALL; BACHERE; MIALHE, 1991) e *N. nodosus* (SCHLEDER et al., 2008), e nos mexilhões *M. edulis* (PIPE, 1992) e *M. galloprovincialis* (TORREILLES; GUÉRIN, 1999). Contudo, até o presente momento, não há nenhum relato de estudos sobre a produção de ERO por hemócitos de moluscos pterídeos.

Estudos recentes têm mostrado que os fagócitos em metazoários podem controlar microrganismos através da liberação das armadilhas extracelulares de DNA (ETs do inglês *extracellular traps*) que são compostas por histonas e peptídeos antimicrobianos (**Figura 4**). No ano de 2004, foi descrito por Brinkmann e colaboradores um novo mecanismo antimicrobiano que conta com a liberação de redes extracelulares de DNA por neutrófilos de mamíferos que transportam histonas e proteínas antimicrobianas provenientes dos grânulos citoplasmáticos, incluindo peptídeos antimicrobianos e hidrolases (BRINKMANN et al., 2004; PAPAYANNOPOULOS et al., 2009). As ETs são capazes de reter e, eventualmente, matar bactérias, fungos, parasitas e vírus (BRINKMANN et al., 2004; JENNE, et al., 2013; GUIMARÃES-COSTA et al., 2012). A formação de ET depende da produção de ERO (WANG, et al., 2009) e pode ser induzida por diferentes estímulos imunológicos incluindo PAMPs ou mediadores inflamatórios associados tecidos danificados (BRINKMANN et al., 2004; WANG et al., 2009). A evidência de ETs na defesa de invertebrados, incluindo ostras da espécie *C. gigas* é recente (POIRIER et al., 2014). Em ostras, os hemócitos demonstraram formar

ETs associados com histonas e peptídeos antimicrobianos, rapidamente após uma exposição a diversos agentes microbianos ou danos nos tecidos tanto *in vitro* como *in vivo* (POIRIER et al, 2014).

As principais funções dos hemócitos dos bivalves marinhos estão representadas pela **Figura 4**, baseada em inúmeros estudos na espécie de ostra mais cultivada mundialmente, *C. gigas* (vide revisão de BACHÈRE et al., 2015).

Figura 4: Representação esquemática das principais funções hemocitárias em ostras *Crassostrea gigas*



Fagocitose: após o reconhecimento, os microrganismos estranhos são fagocitados e podem ser destruídos pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), através do complexo NADPH oxidase e moléculas de defesa (peptídeos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas e outros imuno-efetores) armazenados nos grânulos e que se fundem ao fagossomo; **Armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos:** após uma exposição a agentes microbianos ou danos nos tecidos, os hemócitos liberam armadilhas extracelulares de DNA (ET) associadas a histonas e peptídeos antimicrobianos que estão contidos nos grânulos; **Indução de genes imunológicos:** hemócitos podem ser ativados por diferentes mecanismos, incluindo danos no tecido, estresse e reconhecimento microbiano por ambas as proteínas solúveis e proteínas/receptores de reconhecimento padrão (PRP), levando à indução da expressão de alguns genes associados ao sistema imune; **Exocitose de imunofatores:** Efeitos imunológicos armazenados em grânulos ou vesículas citosólicas são liberados no plasma, nos espaços extracelulares e/ou nas cavidades corporais do molusco. (adaptado de BACHÈRE et al., 2015)

1.1.6 Proteínas de Reconhecimento-Padrão do tipo Aglutininas ou Lectinas

Os invertebrados marinhos precisam defender-se contra uma variedade de patógenos, sendo assim, o mecanismo de reconhecimento do não próprio é um processo crucial no desencadeamento de uma resposta imune. Como descrito anteriormente, sabe-se que os invertebrados não possuem moléculas de reconhecimento altamente específicas dos vertebrados, como os anticorpos. Entretanto, estudos recentes demonstram que alguns invertebrados podem sintetizar, de maneira aleatória, proteínas imunológicas com uma grande variabilidade de sequências. Exemplos dessas moléculas hipervariáveis são as Dscam dos artrópodes (do inglês, *Down syndrome cell adhesion molecule*) e as proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs, do inglês *fibrinogen-related proteins*) dos moluscos. Em alguns casos, evidências apontam para uma diversidade molecular associada à capacidade do hospedeiro em montar respostas imuno-específicas ao agente patogênico em questão (*vide* revisão de (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2013).

Nos invertebrados, os principais PAMPs reconhecidos por PRPs são os lipopolissacarídeos (LPS) da superfície de bactérias Gram-negativas, as peptidoglicanas e o ácido lipoteicoico da parede das bactérias Gram-positivas, as β -1,3-glicanas da parede dos fungos, o RNA dupla-fita ou dsRNA (do inglês, *double-stranded RNA*) de vírus e sequências de DNA não metilado de microrganismos (WANG et al., 2013).

Os moluscos bivalves podem expressar uma variedade de proteínas de reconhecimento e efetores extracelulares induzíveis, tais como lectinas, proteínas de reconhecimento de peptidoglicana (PGRP), proteínas contendo tioéster ou TEPs (*thioester containing proteins*), proteínas que se ligam a β -1,3-glicanas (β GBP), FREPs e proteínas antimicrobianas (ALLAN; RAFTOS, 2015).

Dentre as proteínas plasmáticas, que participam das respostas humorais dos moluscos, destacam-se as aglutininas do tipo lectinas. As lectinas são proteínas sem atividade catalítica, que possuem a capacidade de unir-se a carboidratos específicos da superfície de diferentes células, incluindo microrganismos, causando sua aglutinação e opsonização (VARGAS – ALBORES; BARRACO, 2001).

Estudos realizados por Vasta e colaboradores (1982 e 1984) foram os primeiros a demonstrar a presença de lectinas em bivalves (*C. virginica*), associadas à membrana plasmática dos hemócitos, que servia de receptor para o reconhecimento de moléculas não próprias. Além da

propriedade de reconhecimento e aglutinação, algumas lectinas foram descritas como sendo capazes de aumentar a taxa de fagocitose dos microrganismos com os quais reagiram, funcionando como opsoninas (BARRACCO; DA SILVA, 2008). Nos moluscos, o primeiro relato sobre o aumento da taxa de fagocitose de bactérias (*Vibrio anguillarum* e *Escherichia coli*) quando pré-tratadas com lectinas purificadas, ocorreu em ostras *C. gigas* (HARDY et al., 1977).

Durante as últimas décadas, várias lectinas foram identificadas em moluscos bivalves, como em na ostra *C. gigas*, *M. edulis* e *C. virginica*. Na ostra *C. gigas* foram identificadas proteínas de reconhecimento de peptidoglicanas (ITOH; TAKAHASHI, 2009; ITOH et al., 2010), proteínas de ligação beta-glicana (ITOH; TAKAHASHI, 2009; TANGUY; GUO; FORD, 2004) e outras lectinas (GUEGUEN et al., 2003; YAMAURA; TAKAHASHI; SUZUKI, 2008). No mexilhão *M. edulis* foi demonstrado que as lectinas estimularam a fagocitose de leveduras e eritrócitos pelos seus hemócitos (RENWRANTZ; STAHRMER, 1983). Na ostra *C. virginica*, foi isolada uma lectina do tipo “glectina”, que reconhece especificamente galactosamina e N-acetilgalactosamina (FENG et al., 2013) e que reconhece *P. marinus* (TASUMI; VASTA, 2007).

Em relação às ostras perlíferas, alguns estudos já demonstraram a presença de lectinas em algumas espécies da família Pteriidae. Na espécie *P. fucata* foi identificada um gene codificando para uma glectina, cuja expressão aumentou após estímulo com a bactéria marinha *V. alginolyticus* (ZHANG et al., 2011). Na espécie *P. penguin*, foi também identificada uma lectina capaz de reconhecer LPS de bactérias Gram-negativas (NAGANUMA et al., 2006). Na espécie *P. martensii*, foi descrita um gene codificante para uma F-lectina, cuja expressão nos hemócitos aumentou após desafio com o *V. alginolyticus* (CHEN; XIAO; YU, 2011). A partir do manto da ostra perlífera *P. pinguim* foram isoladas duas lectinas, PPL2A e PPL2B, que estão envolvidas na formação da concha desta espécie (NAGANUMA et al., 2014).

De maneira geral, pouco ainda se conhece a respeito do sistema imune de moluscos da família Pteriidae, apesar do seu grande potencial para a aquicultura. Assim, o estudo do sistema imune de *P. hirundo* contribuirá para ampliar o conhecimento a respeito da biologia de uma das espécies dessa família, tendo em vista que é importante conhecer de maneira mais aprofundada os mecanismos de defesa utilizados pelos bivalves cultivados. Desta forma o presente estudo poderá dar subsídios para compreender aspectos de defesas contra patógenos e fornecer informações importantes para a prevenção e controle de enfermidades nas

larviculturas e nos cultivos desta espécie, o que poderá contribuir para a viabilização de cultivos comerciais de ostras perliíferas em Santa Catarina.

1.2 HIPÓTESES

1. A hemolinfa da ostra perliífera *Pteria hirundo* possui pelo menos duas populações de hemócitos (granulares e hialinos), os quais são capazes de reconhecer e fagocitar partículas estranhas e de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO).
2. A hemolinfa de *P. hirundo* possui moléculas que reconhecem e aglutinam bactérias potencialmente patogênicas, com as vibrionáceas, e seu hemograma pode ser alterado mediante uma infecção por essas bactérias.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Caracterizar ultraestruturalmente os hemócitos da ostra perliífera *P. hirundo*, bem como identificar as suas populações hemocitárias e avaliar algumas das suas respostas celulares e humorais de defesa.

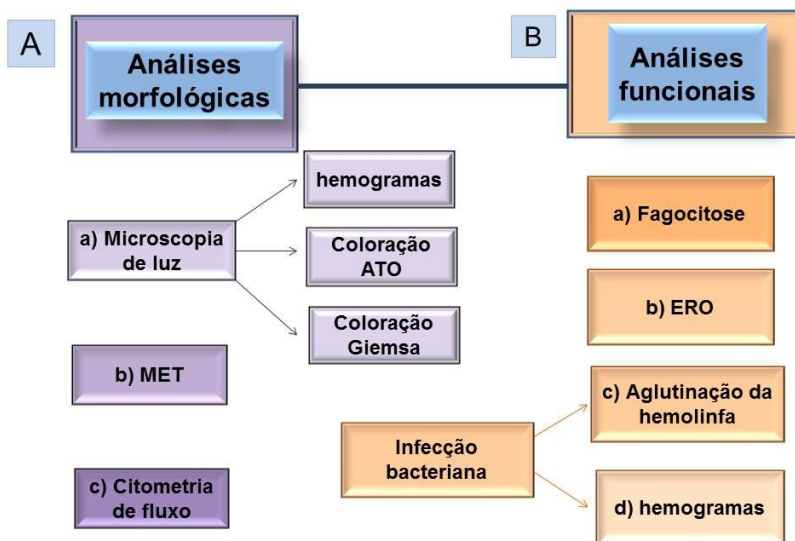
1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar morfológica e ultraestruturalmente os hemócitos de *P. hirundo*;
- Identificar e determinar a proporção das populações hemocitárias;
- Avaliar a capacidade fagocítica dos hemócitos;
- Avaliar a capacidade dos hemócitos em produzir espécies reativas de oxigênio (ERO);
- Comparar a capacidade aglutinante da hemolinfa e o número total de hemócitos de animais desafiados ou não com a bactéria *Vibrio alginolyticus*.

1.4 ETAPAS METODOLÓGICAS

As principais etapas metodológicas realizadas no presente estudo estão apresentadas na **Figura 5** e o artigo resultante será submetido para publicação na revista *Fish & Shellfish Immunology*.

Figura 5: Esquema das etapas metodológicas utilizadas neste estudo para a caracterização morfo-funcional dos hemócitos da ostra perlífera *Pteria hirundo*.



(A) As diferentes populações hemocitárias foram identificadas por (a) citometria de fluxo [considerando tamanho *versus* granulosidade celular (FSC vs SSC)]; (b) Microscopia eletrônica de transmissão (MET), para caracterização ultraestrutural e, (c) Microscopia de luz [hemogramas (THC) e colorações com azul de toluidina (ATO) e Giemsa]. (B) Alguns aspectos funcionais dos hemócitos foram avaliados, através da: (a) capacidade em fagocitar partículas inertes (Fagocitose), (b) produção de espécies reativas de oxigênio (ERO); Em animais infectados (n= 9) ou não infectados (n= 9) com a bactéria *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749, através da: (c) capacidade aglutinante da hemolinfa (Aglutinação da hemolinfa) e (d) contagem de hemócitos totais (THC).

2. ARTIGO CIENTÍFICO

“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ULTRAESTRUTURAL DOS HEMÓCITOS DA OSTRÁ PERLÍFERA *Ptereria hirundo*”

Graziela Cleuza Vieira^a, Patrícia Mirella da Silva^b, Margheritta Anna Barracco^a, Augusto Ferrari Hering^a, Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque^c, Éder Carlos Schmidt^d, Zenilda Laurita Bouzon^d, Rafael Diego Rosa^a, Luciane Maria Perazzolo^{a,*}

^aLaboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

^bLaboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados, Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil.

^cLaboratório de Moluscos Marinhos (UFSC), Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil.

^dLaboratório de Biologia Celular Vegetal Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

*Autor correspondente: Tel.: +55 48 3721 4196; Fax: +55 48 3721 5528
E-mail: l.m.perazzolo@ufsc.br (L.M. Perazzolo)

ABSTRACT

The pearl oyster *Pteria hirundo* (Pteridae family) has a great potential in national aquaculture due to its gastronomic appeal and to its capacity to produce pearls. Despite of its economic importance, little is known about its physiology and immune system. Thus, the aim of the present study was to identify and characterize at morphological and ultrastructural levels the hemocytes of *P. hirundo*, as well to identify its hemocyte populations and evaluate some cellular and humoral defenses in response to a bacterial infection. Three main hemocyte populations were recognized, represented by hyaline hemocytes (HH), granular hemocytes (GH) and blast cells (BC). The most abundant population comprised the hyaline hemocytes (88.2%) which were characterized by the presence few or no granules in the cytoplasm, followed by the granular hemocytes (9.4%) which have a great number of large electron lucid granules, and blast cells (2.4%) which were the smallest hemocytes, showing a spherical format and a high nucleus/cytoplasm ratio. Three different subpopulations of HH were identified (HH-1, HH-2 and HH-3), showing differences in terms of cellular volume and internal complexity. The hemocytes showed an elevated phagocytic capacity *ex-vivo* for inert particles (38.5% of the evaluated hemocytes). Besides, these cells are able to produce microbicidal molecules, such as reactive oxygen species (ROS), but the production of these molecules were not induced by bacterial lipopolysaccharides (LPS). The main ROS-producing cells were the HH-1, GH and HH-3. The presence of agglutinating molecules in the hemolymph of pearl oysters pre-challenged with the Gram-negative *Vibrio alginolyticus* was demonstrated by the *in vitro* agglutination of marine *Vibrio* species, *V. harveyi* and *V. alginolyticus* (agglutinating title of 256× and 1024×, respectively). However, the marine Gram-positive bacteria *Mycobacterium maritypicum* and *Corynebacterium stationis* were not agglutinated by the oyster hemolymph. The total count of circulating hemocytes in apparently healthy animals was $8.53 \pm 4.27 \times 10^6$ cells/mL, but after an experimental injection of a bacterial solution (*V. alginolyticus*) or saline, the number of hemocytes significantly dropped ($4 \times$; 3.77 to 4.05×10^6 cells/mL). In conclusion, the hemolymph of *P. hirundo* contains the typical hemocyte types found in bivalves and the ultrastructural and functional characterization of these cells represents a pioneering study that opens new perspectives for a better understanding of the immune reactions of this pearl oyster, aiming the prevention and control of infectious diseases in pteridean species of aquaculture importance.

Keywords: bivalve immunity, hemocytes, functional characterization, ultrastructural characterization.

RESUMO

A ostra perlífera *Pteria hirundo* possui um grande potencial para a aquicultura nacional, pois além de apresentar potencialidade para o consumo, essa espécie possui a capacidade de produzir pérolas. Apesar do seu potencial para cultivo, pouco ainda se conhece a respeito da sua fisiologia e sistema imune. O presente estudo teve por objetivo identificar e caracterizar morfológica e ultraestruturalmente os hemócitos de *P. hirundo*, bem como identificar as populações hemocitárias e avaliar algumas respostas celulares e humorais de defesa frente a uma infecção bacteriana. Três populações de hemócitos foram encontradas: hemócitos hialinos (HH), hemócitos granulares (HG) e células blásticas (CB). A população mais abundante na circulação foi a de HH (88,2%), que se caracterizaram pela presença de poucos a nenhum grânulo em seu citoplasma, seguida pelos HG (9,4%) com muitos grânulos grandes e elétrons-lúcidos no citosol, e as CB (2,4%) que foram os menores hemócitos e se caracterizaram por possuir forma esférica e uma alta razão núcleo-citoplasma. Três diferentes subpopulações de HH foram identificadas (HH-1, HH-2 e HH-3), apresentando diferenças quanto ao tamanho celular e à complexidade interna. Os hemócitos apresentaram uma elevada capacidade fagocítica *ex vivo* de partículas inertes (38,5% dos hemócitos avaliados). Além disso, essas células mostraram-se aptas a produzir moléculas microbicidas como as espécies reativas de oxigênio (ERO), porém esta produção não foi induzida por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. Os principais produtores deste composto microbicida foram os HH-1, HG e HH-3. A presença de moléculas aglutinantes na hemolinfa de ostras previamente desafiadas com a *Vibrio alginolyticus* foi demonstrada por meio da aglutinação *in vitro* de bactérias marinhas *Vibrio harveyi* e *V. alginolyticus* (título aglutinante 256× e 1024×, respectivamente). Contudo, as bactérias marinhas Gram-positivas, *Mycobacterium maritropicum* e *Corynebacterium stationis* não foram aglutinadas. O número total de hemócitos circulantes (THC) nas ostras sadias foi de $8,53 \pm 4,27 \times 10^6$ células/mL, no entanto 24 h após infecção com *V. alginolyticus* (ou injeção com salina), o hemograma caiu pela metade. A caracterização ultraestrutural e funcional dos hemócitos de *P. hirundo* abre perspectivas para estudos visando à prevenção e ao controle de enfermidades em pterídeos com interesse aquícola.

Palavras-chave: imunidade de bivalves, hemócitos, caracterização funcional, caracterização ultraestrutural.

2.1 INTRODUÇÃO

Apesar da ampla diversidade de moluscos marinhos encontrados no Brasil, o cultivo desses animais restringe-se basicamente às espécies comestíveis como a *Crassostrea gigas*, *Crassostrea rizophorae*, *Perna perna* e *Nodipecten nodosus*. Neste contexto, destacam-se os moluscos da família Pteriidae, que além de seu potencial para consumo, possuem ainda a capacidade de produzir pérolas (URBAN, 2000). No caso do Brasil, a ostra perlífera com maior potencial para cultivo é a espécie *Pteria hirundo*, devido às suas características zootécnicas apresentadas na larvicultura e nos cultivos experimentais (ALBUQUERQUE et al., 2012). A produção e o comércio de espécies de bivalves marinhos são vulneráveis às condições ambientais e a surtos de doenças (BARBOSA SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015b), onde todos os estágios no processo de produção dos moluscos podem ser afetados, incluindo as larvas e pós-larvas em laboratórios, juvenis e adultos que são cultivados em mar aberto ou baías. (BARBOSA SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015b).

Os moluscos bivalves possuem apenas um sistema imunológico do tipo inato, não possuindo uma imunidade do tipo adaptativa como ocorre nos vertebrados (SCHMITT et al., 2012a). Sendo assim, a vacinação convencional não é uma prática viável para proteger esses animais contra as infecções (MOREAU et al., 2015). As respostas de defesa contra microrganismos compreendem a ação sinérgica entre as reações celulares e as reações humorais, onde atuam moléculas imunoefetoras dissolvidas no plasma (BARRACCO; DA SILVA, 2008).

Os microrganismos invasores podem ser detectados via humoral e pelos receptores da superfície dos hemócitos, desencadeando assim a produção de citocinas que medeiam o recrutamento de hemócitos para realizarem fagocitose e produzirem/liberarem uma vasta gama de moléculas citotóxicas e microbicidas (ALLAM; RAFTOS, 2015). Entre os principais mecanismos de defesa atualmente reconhecidos em moluscos bivalves estão: (i) o reconhecimento do não-próprio, via receptores plasmáticos ou celulares, e a sinalização intracelular; (ii) reações celulares (infiltração hemocitária, fagocitose, formação de nódulos e cápsulas e de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos) e, (iii) a produção de moléculas citotóxicas e antimicrobianas, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), as lisozimas e os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (vide a revisão SCHMITT, 2012).

De acordo com a classificação clássica de Cheng (1981) e Hine (1999), os hemócitos dos bivalves são subdivididos em duas grandes

populações celulares: hemócitos granulares (ou granulócitos) e hemócitos hialinos (ou hialinócitos). Os *hemócitos granulares* (HG) apresentam tamanho variado, com muitos grânulos citoplasmáticos onde são armazenados diferentes moléculas imunofetoras (SCHMITT et al., 2012). Os *hemócitos hialinos* (HH) se caracterizam por possuírem nenhum ou poucos grânulos no citosol e são, normalmente, subdivididos em duas classes: (i) células indiferenciadas ou blásticas, com uma alta relação núcleo/citoplasma e (ii) células basófilas maiores, semelhantes a macrófagos (BARRACCO; DA SILVA, 2008).

No que se referem aos Pteriídeos, os hemócitos de apenas duas espécies foram descritos até o momento. Na espécie *P. imbricata* foram identificados em sua hemolinfa, hemócitos hialinos, granulares e células serosas ou *brown cells* (KUCHEL et al., 2010), enquanto que na espécie *P. fucata* foram descritos hemócitos granulares e hemócitos hialinos grandes e pequenos (LI et al., 2015).

Os hemócitos desempenham um papel essencial na defesa de moluscos, sendo capazes de produzir respostas rápidas contra patógenos ou em tecidos danificados através da quimiotaxia e fagocitose (BACHÈRE et al., 2004; CHENG et al., 1981). A fagocitose é um processo constitui a primeira linha de defesa celular para o controle da invasão dos microrganismos onde o agente estranho é reconhecido e endocitado pelos hemócitos (BACHÈRE et al., 2015). Dentro do fagolisossomo são lançados compostos citotóxicos e microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio (ERO), que levam à rápida neutralização/degradação dos microrganismos (BACHÈRE et al., 2015). A fagocitose é, portanto, acompanhada pela produção de ERO que leva a um importante aumento no consumo de oxigênio em nível intracelular, conhecido como *burst* respiratório (ALLAN; RAFTOS, et al., 2015). Os estudos sobre a produção de ERO pelos hemócitos dos bivalves são comumente utilizados para compreender e caracterizar as respostas imunológicas frente a infecções microbianas (DANG et al., 2011) e parasitárias (QUEIROGA et al., 2013).

Os fatores humorais abrangem uma variedade de proteínas de reconhecimento, capazes de reconhecer padrões moleculares específicos presentes na superfície dos microrganismos/patógenos (PRP: *pattern recognition proteins* e M/PAMP: *microbe/pathogen-associated molecular patterns*) e uma série de moléculas imunofetoras plasmáticas (ENGELMANN et al., 2005, MUTA 2006). Dentre elas, destacam-se as aglutininas do tipo lectinas. Lectinas são proteínas sem atividade catalítica, que possuem a capacidade de unir-se a carboidratos específicos da superfície de diferentes células, incluindo microrganismos, causando

sua aglutinação e opsonização (VARGAS– ALBORES; BARRACO, 2001).

As bactérias desempenham papéis importantes no ambiente marinho, como ciclagem de nutrientes, parasitismo de outras espécies, podendo influenciar a saúde do hospedeiro (ZILBER-ROSENBERG e ROSENBERG, 2008). As bactérias marinhas têm impactado o cultivo moluscos marinhos afetando principalmente as fases iniciais (ELSTON et al., 2008). Algumas bactérias Gram-positivas podem afetar a saúde de moluscos (KAZDA; PAVILIK; FALKINHAM; HRUSKA, 2009). Entre as bactérias potencialmente patogênicas para bivalves, destacam-se as do gênero *Vibrio* spp., ricas no ambiente marinho e que se caracterizam por serem baciliformes e Gram-negativas (SAWABE et al., 2013). *Vibrio alginolyticus* e *V. harveyi* têm sido responsáveis por surtos de mortalidade nos cultivos de moluscos em todo mundo (THOMPSON et al., 2004; SAULNIER et al., 2010; RUWANDEEPIKA et al., 2012).

Os estudos a respeito das respostas imunes dos bivalves são normalmente realizados mediante à caracterização ultraestrutural e das atividades funcionais dos hemócitos em animais sadios e/ou infectados por patógenos de interesse (QUEIROGA et al., 2013, HÉGARE et al., 2003 a,b; REBELO et al., 2013; MOREAU et al., 2015). Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar ultraestruturalmente as populações de hemócitos de *P. hirundo*, bem como avaliar algumas de respostas de defesa humoral (aglutinação de microrganismos) e celular (fagocitose e produção de ERO) desse bivalve frente infecções por *V. alginolyticus* ou corpos estranhos inertes.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Animais

Foram utilizados indivíduos adultos ($58,29 \pm 7,86$ mm de altura e $54,70 \pm 12,60$ g), machos e fêmeas aparentemente sadios da espécie de ostra perlfífera *Pteria hirundo* cultivados no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado na praia de Sambaqui, Florianópolis/SC (27° 28' 30" S e 48° 33' 40" W). Após coletados, os animais foram imediatamente transferidos para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/BEG), onde permaneceram por três dias acondicionados em aquários de 40 L, contendo 20 L de água do mar (salinidade 34-35), mantidos sob aeração constante e à temperatura da sala a 20°C, até a sua utilização.

2.2.2 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa foi extraída diretamente do músculo adutor, utilizando-se uma agulha (21G) acoplada a uma seringa estéril (1 mL) resfriada a 0°C. Dependendo da análise a ser realizada, a coleta de hemolinfa apresentou algumas modificações.

Para a contagem total de hemócitos (THC, do inglês *Total Hemocyte Count*) a coleta foi realizada individualmente, em animais submetidos ou não a uma infecção experimental bacteriana (item 2.4.), na forma de 3 *pools* de 3 animais/tratamento. A hemolinfa foi coletada em presença de uma solução antiagregante (solução de Alsever modificada ou MAS: 27 mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,2), acrescida de 4% de formaldeído (1:2 hemolinfa:solução MAS fixadora).

Para as análises ultraestruturais, a hemolinfa foi coletada de animais sadios diretamente em solução fixadora contendo 2,5% glutaraldeído, em tampão cacodilato de sódio 100 mM (pH= 7,2) acrescido de 6% dextrose. A hemolinfa foi coletada na forma de um *pool* (n=10 animais), permanecendo na solução fixadora por 2 h e processadas para visualização em MET, como detalhado no item 2.5.

Para a coloração de Giemsa, a hemolinfa foi coletada na forma de *pool* (n=4) na presença de MAS (1:2, hemolinfa:MAS), conforme descrito acima. A solução celular foi lavada duas vezes em MAS (800 ×g por 10 min a 4°C) antes de ser processada, como detalhado no item 2.6.

Para as análises da capacidade *ex vivo* dos hemócitos em fagocitar e produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como para a identificação das populações hemocitárias, a hemolinfa de animais sadios foi coletada individualmente (n=6), sem a presença de antiagregante e analisadas em citômetro de fluxo (item 2.7.).

Para as análises populacionais dos hemócitos, a hemolinfa de animais sadios foi coletada individualmente (n=6), sem a presença de antiagregante, fixadas com formol 2% e analisadas em citômetro de fluxo (item 2.7.).

Por fim, para as análises de capacidade aglutinante da hemolinfa, as coletas foram individuais em animais submetidos ou não a uma infecção experimental bacteriana, na forma de 3 *pools*/3 animais/tratamento. As amostras de hemolinfa, foram mantidas a 0°C e sonicadas com 5 ciclos de 20 s, a uma frequência de 80 KHz, usando intervalos de 1 min/ciclo (LABSONIC®). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 ×g por 10 min a 4°C, alíquotadas e estocadas a -20°C para as análises posteriores (item 2.8.).

2.2.3 Hemograma: contagem total de hemócitos (THC)

Para a contagem total de hemócitos, alíquotas de hemolinfa (10 μ L) de cada amostra foi misturada a solução antiagregante MAS (1:9 hemolinfa:MAS) e o número de células estimado em câmara de Neubauer, em triplicatas, conforme protocolo preconizado para a contagem de leucócitos humanos (BEÇAK e PAULETE, 1976).

2.2.4 Infecção bacteriana experimental

Para os desafios microbianos utilizou-se a bactéria marinha Gram-negativa *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749, a partir de uma cultura bacteriana em meio LB-NaCl (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 3% NaCl, pH 7,2), mantida por 16 h a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e sob agitação constante (120 rpm). Após o período de crescimento, a cultura foi centrifugada ($1.000 \times g$ por 10 min) e suspensa em PBS-salina (PBS Laborclin[®] acrescido de 2,1% NaCl; pH 7,2). A concentração bacteriana foi então ajustada a 8×10^6 CFU (Unidade Formadora de Colônias) por mL, correspondendo a uma densidade óptica de 2,5 ($\text{DO}_{600\text{nm}}$; espectrofotômetro WPA[®]).

Para as injeções, os animais foram retirados dos aquários e mantidos fora da água por 30 min a fim de promover a abertura total das valvas. Em seguida, o grupo experimental ($n=9$) recebeu injeções de 100 μ L/animal da suspensão bacteriana de *V. alginolyticus* (8×10^5 CFU/animal) no músculo adutor utilizando uma agulha (21G) acoplada a uma seringa estéril (1 mL), segundo protocolo adaptado de Duperthuy e colaboradores (2010). Um dos grupos controle ($n=9$) recebeu o mesmo volume de injeção, porém com o veículo (PBS-salina) e, o outro grupo controle ($n=9$), não foi manipulado (animais *naïve*). A coleta de hemolinfa (item 2.2.) foi realizada nos três grupos experimentais, 24 h após as injeções.

2.2.5 Análises ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A hemolinfa coletada em solução fixadora (item 2.2.) foi centrifugada a $800 \times g$ a 4°C por 10 min, o plasma descartado e a fração celular suspensa e lavada 3 vezes por centrifugação em tampão cacodilato de sódio 100 mM (pH 7,2). Os hemócitos foram, então, pós-fixados com 1% tetróxido de ósmio (OsO_4) diluído em tampão cacodilato de sódio 100 mM (pH 7,2), por 1 h a 20°C . Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação (como acima) no mesmo tampão e desidratadas

em banhos com série crescente de etanol ($1 \times 70\%$; $1 \times 95\%$; $2 \times 100\%$), com intervalos entre as etapas de 10 min ou *overnight* (etanol 95%).

Os hemócitos desidratados foram então embebidos em solução de etanol-acetona (1 etanol 100%:1 acetona 100%), por 10 min a 20°C e, em seguida incubados numa solução pura de acetona por 45 min. Após, as células foram incluídas em resina Spurr (Spurr, 1969), a partir de duas incubações iniciais em soluções de resina-acetona (1 resina:2 acetona; 2 resina:1 acetona), por 1,5 h., seguidas por duas incubações finais de 2,5 h em resina pura. A polimerização do material ocorreu durante 24 h a 70°C.

Secções semifinas foram inicialmente preparadas em ultramicrotomo (Power Tome XL, RMC Products) para avaliar a qualidade das amostras. Para tal, os cortes (200 nm) foram aderidos por 5 min a 50°C em lâminas (26 × 76 mm) e corados com solução alcoólica de azul de toluidina (0,25% azul toluidina diluído em 1 mL álcool etílico PA), a partir de um rápido aquecimento da lâmina diretamente na chama (10 s) e lavagem abundante com água destilada. Em seguida, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá para serem observadas ao microscópio óptico de luz (Olympus Bx41), no Laboratório Multiusuários em Estudos de Biologia (LAMEB) da UFSC.

Secções ultrafinas (70 nm) foram então preparadas em ultramicrotomo, montadas em grátulas de cobre, contrastadas com solução de acetato de uranila 1% acrescido de citrato de chumbo 1% (BOUZON *et al.*, 2006) e observadas ao MET (Jeol, modelo JEM-1011), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

2.2.6 Coloração dos hemócitos com Giemsa

Amostras de hemolinfa coletadas em MAS foram depositadas sobre lamínulas estéreis (22×22 mm) contendo cloreto de cálcio (CaCl_2), na concentração final de 20 mM, e incubadas por 20 min a 20°C para ocorrer a adesão celular. Após adesão, as monocamadas celulares foram fixadas com metanol por 10 min e lavadas 2× em água destilada. Em seguida, os hemócitos foram corados com uma solução de Giemsa em PBS (1:6, v:v) durante 15 min e lavados em água destilada. Após secas, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico de luz (Olympus Bx41) (LAMEB) e os hemócitos foram fotografados quando oportuno.

2.2.7 Análises em citometria de fluxo

Todas as análises abaixo foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), no LAMEB, UFSC.

2.2.7.1 Identificação das populações hemocitárias

As células fixadas foram incubadas com o reagente SYBR®Green I (Molecular Probes, concentração final 10^{-4} da solução original), um fluoróforo que intercala no DNA de todas células (vivas ou mortas), em fluxo médio no citômetro. Para tal, as suspensões celulares foram incubadas com o fluoróforo por 1 h, a 20°C. Esta marcação auxiliou na identificação morfológica das populações de hemócitos (detector FL1; $\lambda=530$ nm; 10.000 células/animal), considerando no citograma o tamanho *versus* a complexidade interna celular (**FSC** - *Forward Scatter* vs **SSC** - *Side Scatter*). A complexidade interna indica a presença de grânulos/vesículas, organelas e núcleo presentes no citoplasma. Os valores obtidos representam unidades arbitrárias (U.A.) (HÉGARET et al. 2003a).

2.2.7.2 Capacidade fagocítica *ex-vivo* dos hemócitos

Para os ensaios de fagocitose, a hemolinfa de 6 animais foi coletada individualmente em tubos de citometria e incubada com uma solução de microesferas fluorescentes de látex (Fluoresbrite® Yellow Green Microspheres, 2 μ m, Polysciences, Inc, 18338-5), diluídas em água do mar estéril ($1,1 \times 10^8$ partículas/mL). A proporção de hemócitos por microesferas foi de 10:1 (partículas:hemócito). Como controle, analisou-se a hemolinfa sem microesferas. O histograma de fluorescência (detector FL1; $\lambda = 530$ nm) foi utilizado para mensurar os picos correspondentes à porcentagem total de fagocitose e à porcentagem de hemócitos que fagocitaram 1, 2, 3 e 4 ou mais microesferas (HÉGARET et al. 2003b). As análises foram realizadas em fluxo médio, no citômetro. Após as análises, as amostras de hemolinfa foram fixadas com 4% paraformaldeído (concentração final). Em seguida, as lâminas foram montadas para serem observadas ao microscópio de fluorescência (Olympus Bx41) (LAMEB) para que os hemócitos fagocíticos fossem fotografados quando oportuno.

2.2.7.3 Produção *ex-vivo* de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Para as análises de produção de ERO, a hemolinfa coletada foi dividida em tubos de citometria, contendo: (a) 300 μ L de hemolinfa para estimar a produção basal de ERO (controle); (b) 297 μ L de hemolinfa acrescida de 3 μ L de uma solução de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, Sigma, concentração final 50

$\mu\text{g/mL}$). Imediatamente, o fluoróforo 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, Sigma, concentração final 10 μM) foi adicionado aos tubos e a mistura incubada por 1 h a 20 °C. O DCFH-DA é uma molécula hidrofóbica que penetra na célula e é subsequentemente clivada por esterases intracelulares. A oxidação provocada pela presença de ERO intracelulares, converte o DCFH em DCF (2',7'-diclorofluoresceína), que emite fluorescência detectada pelo citômetro.

A fluorescência das células (10.000 células /animal) foi analisada no detector FL1 ($\lambda = 530 \text{ nm}$) (HÉGARET et al. 2003b). A média geométrica da intensidade de fluorescência dos hemócitos, indicativa da produção de ERO, foi expressa em unidade arbitrária (A.U). As análises foram realizadas em fluxo médio, no citômetro.

2.2.8 Capacidade aglutinante da hemolinfa

A presença de moléculas aglutinantes (aglutininas/lectinas) na hemolinfa de *P. hirundo* foi avaliada em amostras sonicadas de animais desafiados ou não com *V. alginolyticus* (itens 2.2. e 2.4.). Para tal, incubou-se a hemolinfa com uma das quatro bactérias marinhas (i) Gram-negativas: *V. alginolyticus* ATCC 17749 ou *Vibrio harveyi* ATCC 14126 e (ii) Gram-positivas: *Mycobacterium maritropicum* CPI 1057335 ou *Corynebacterium stationis* CPI 101282. As cepas de bactérias Gram-positivas foram gentilmente cedidas pela Dr^a. Evelyne Bachère, do *Laboratoire de Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements*, Université Montpellier II (França). Inicialmente, cultivou-se as bactérias em meio LB-NaCl (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 3% NaCl, pH 7,4), por 12 h a 20°C e sob agitação constante (120 rpm). Posteriormente, as bactérias foram inativadas por incubação *overnight* com 2% formaldeído. Em seguida, as soluções bacterianas foram centrifugadas a $2.000 \times g$ por 10 min a 20°C e as células lavadas por centrifugação 3 vezes em tampão TBS-lectina (50 mM Tris, 5 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2 e 330 mM NaCl, pH 7,4). A fim de avaliar a efetividade da inativação, alíquotas de cada cultura bacteriana foram submetidas a um novo crescimento. Após confirmação da inativação, a concentração bacteriana foi ajustada a uma densidade óptica de 2,0 ($\text{DO}_{600\text{nm}}$; espectrofotômetro WPA®) e utilizada nos ensaios de aglutinação.

A titulação de lectinas/aglutininas foi realizada com alíquotas de 50 μL de hemolinfa sonicada (3 *pools* de 3 animais/grupo), diluídas serialmente em TBS-lectina em microplacas de 96 poços (fundo em “U”) e incubadas com mesmo volume de uma das suspensões bacterianas acima. As microplacas foram incubadas em câmara úmida, por 4 h a 20°C.

O título aglutinante natural da hemolinfa foi observado em microscópio invertido (Axiovert 25[®]), sendo expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.2.9 Análises estatísticas

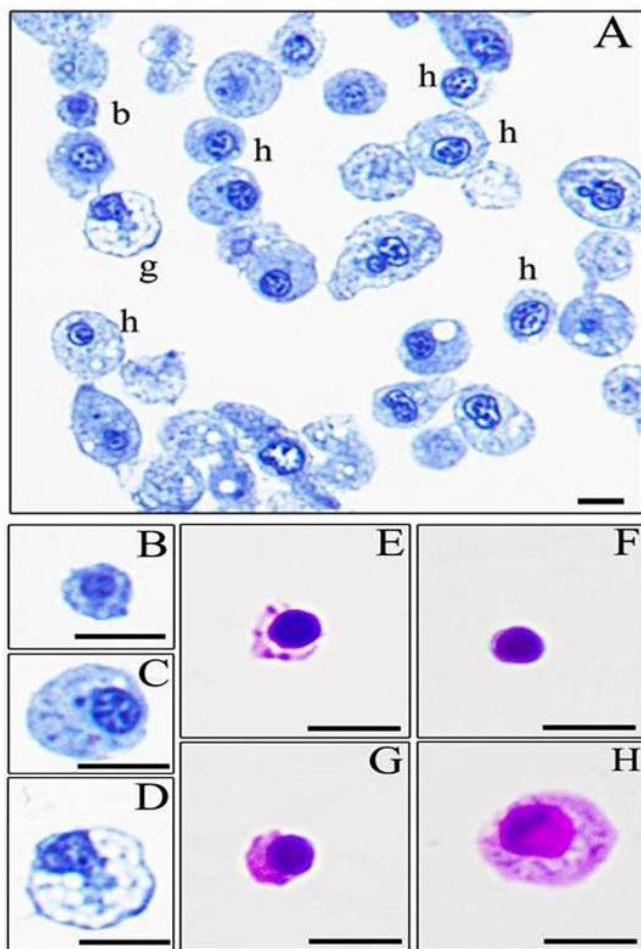
Significâncias estatísticas ($P < 0,05$) entre os dados de THC dos diferentes grupos experimentais, fagocitose e produção de ERO foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey. Os valores da atividade aglutinante foram transformados para \log_2 e os resultados foram analisados por variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação entre médias Tukey. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Todas as análises foram feitas no software GraphPad versão 5.0.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Caracterização morfológica e ultraestrutural dos hemócitos

Observações em microscopia de luz dos hemócitos (animais adultos saudáveis) corados com azul de toluidina e Giemsa demonstraram a presença de três principais tipos celulares: hemócitos granulares (HG), hemócitos hialinos (HH) e células do tipo blásticas (CB) ou *blast-like cells* (**Figura 1**). Os HG apresentaram forma esférica, tamanho variado, sendo caracterizados por possuírem muitos grânulos citoplasmáticos (**Figuras 1A e 1H**). Os HH também variaram bastante em seu tamanho, apresentando forma de esférica à ovalada, porém sempre com nenhum a poucos grânulos em seu citoplasma (**Figuras 1; 1E e 1G**). As CB foram visualmente os menores hemócitos circulantes encontrados, apresentando forma esférica e com uma alta razão núcleo-citoplasma (**Figura 1A, 1B e 1F**).

Figura 1: Fotos de microscopia de luz dos diferentes tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de ostras perlíferas *Pteria hirundo*.



Monocamadas de hemócitos mostrando (A) Diferentes tipos de hemócitos circulantes corados com azul de toluidina: hialinos (**h**), célula blástica (**b**) e granular (**g**). O aumento evidencia (B) células blásticas, (C) hialinas e (D) granulares. Diferentes tipos de hemócitos corados com Giemsa: (E e G) hialinos, (F) célula blástica e (H) granulares. Barra = 5 μ m.

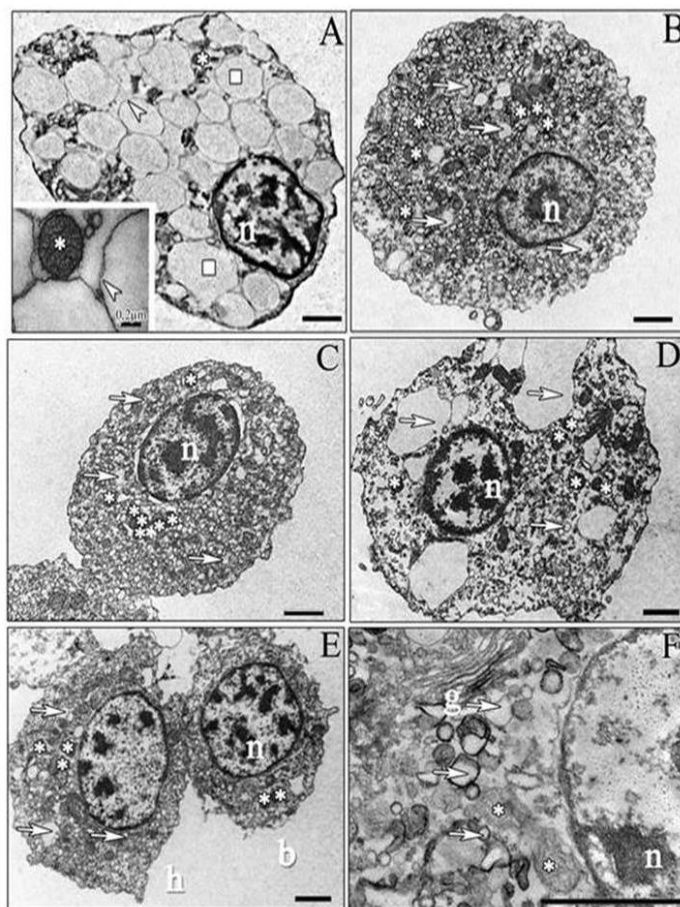
As análises ultraestruturais dos hemócitos (MET) corroboraram os resultados obtidos por microscopia de luz, revelando, porém, características particulares para cada tipo hemocitário (**Figura 2**).

Os HG apresentaram tamanhos de 8,67 a 12,6 μm de diâmetro, contendo muitos grânulos elétron-lúcidos distribuídos no citoplasma (**Figura 2A**). A ampliação dos grânulos evidencia a presença de uma membrana única.

Os HH, por outro lado, apresentaram uma grande diversidade de tamanhos que variaram de 7,2 a 13,1 μm . Os HH apresentaram de nenhum a poucos grânulos dispersos no citoplasma, porém algumas destas células apresentaram grandes vesículas elétron-lúcidas (**Figura 2D**), enquanto outros hemócitos apresentaram o citosol repleto de pequenas vesículas eletron-lúcidas (**Figuras 2B, 2C e 2E**). Esta células apresentaram uma grande quantidade de mitocôndrias em seu citosol (**Figuras 2B, 2C, 2D**). Na **Figura 2F** estão apresentados detalhes citoplasmáticos dos HH, evidenciando um Complexo de Golgi, pequenas vesículas eletron-lúcidas e algumas mitocôndrias.

Por fim, a terceira população foi representada pelas células blásticas que representaram as menores com tamanhos de 4,62 a 6,53 μm e mais raras células da hemolinfa, apresentando ausência de grânulos citoplasmáticos e uma alta razão núcleo-citoplasma (**Figura 2E**). Todos os tipos celulares encontrados apresentaram núcleos excêntricos com heterocromatina. A presença de grânulos eletron-densos não foi observada em nenhum tipo hemocitário.

Figura 2: Micrografias dos diferentes tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa da ostra *Pteria hirundo*.



(A)

Hemócito granular: (n) núcleo com heterocromatina; (□) grânulos eletrôn-lúcidos ocupando grande área do citoplasma; (*) mitocôndrias; (►) membrana única dos grânulos eletrôn-lúcidos, vista em maior aumento na ampliação. (B-C) Dois tipos de hemócitos hialinos (→) vesículas pequenas elétrôn-lúcidas, (*) mitocôndrias. (D) Hemócito hialino: (n) núcleo com heterocromatina, (*) mitocôndrias. (E) (h) Hemócito hialino e (b) Célula blástica: (n) núcleo com heterocromatina, (→) vesículas pequenas elétrôn-lúcidas, (*) mitocôndrias. (F) Ampliação de hemócito hialino: (n) núcleo com heterocromatina, (→) vesículas pequenas elétrôn-lúcidas, (g) Complexo de Golgi, (*) mitocôndrias. Barra = 1 μ m

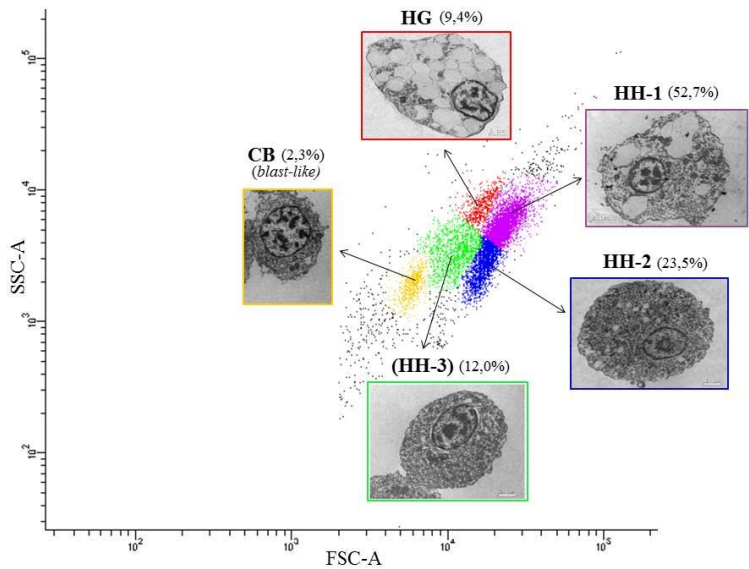
2.3.2 Identificação das populações e subpopulações hemocitárias

Através da citometria de fluxo na hemolinfa de *P. hirundo* foram identificadas três diferentes populações e três subpopulações de hemócitos que se diferenciaram significativamente pela sua complexidade interna (ANOVA; $F=369,46$; $P=0,0000$) e tamanho celular (ANOVA; $F=1125,27$; $P=0,0000$; **Figura 3**), corroborando assim os resultados das análises ultraestruturais. Essas três populações foram representadas por hemócitos granulares ou granulócitos (HG), hialinos ou hialinócitos (HH) e células blásticas (CB).

Os HG, marcados em vermelho na **Figura 3**, apresentaram maior complexidade ($297 \pm 6,6$ U.A.) e tamanho intermediário ($297 \pm 6,6$ U.A.) quando comparados aos demais tipos hemocitários (**Figura 3, Tabela 1**). De maneira interessante, os hialinócitos apresentaram-se em três subpopulações distintas variando em complexidade interna (105 a 210 U.A.) e tamanho celular (440 a 891 U.A.). A primeira subpopulação, aqui denominada *HH-1* apresentou o maior volume ($890,90 \pm 14,77$ U.A.), quando comparada as outras duas subpopulações e uma maior complexidade celular ($210,13 \pm 15,21$ U.A.) (**Figura 3, Tabela 1**). A segunda subpopulação intitulada *HH-2* apresentou volume médio de ($630,63 \pm 17,98$ U.A) e complexidade interna média ($105,20 \pm 45,82$ U.A) (**Figura 3, Tabela 1**). A terceira subpopulação, denominada *HH-3*, apresentou o menor volume celular dos hialinos ($439,95 \pm 34,72$ U. A.) e uma complexidade média ($142,00 \pm 20,90$ U.A). Por fim, uma terceira população hemocitária foi identificada, sendo semelhante às células blásticas (CB), apresentando o menor volume entre todos os hemócitos ($235 \pm 3,2$ U.A.) e a menor complexidade interna ($79 \pm 2,4$ U.A.). Os HG representaram 9,4% dos hemócitos circulantes na hemolinfa de *P. hirundo*.

Os HH representaram 88,2% do total de hemócitos, dividindo-se em três subpopulações: *HH-1* (52,7%), *HH-2* (23,5%) e *HH-3* (12,0%). As CB, que representaram 2,4%.

Figura 3: Citograma representativo da morfologia dos hemócitos de *Pteria hirundo*, considerando o volume celular (**FSC - Forward Scatter**) versus a complexidade interna celular (**SSC - Side Scatter**).



Três populações de hemócitos foram identificadas: HG , HH e CB (2,3%). A população de HH apresentou três subpopulações (HH-1, HH-2, HH-3). A porcentagem de cada população hemocitária, está indicada na figura entre parênteses.

Tabela 1: Tamanho (FSC) e média ± erro padrão da complexidade interna (SSC) celulares das populações (HH, HG e CB) e subpopulações (HH-1, HH-2 e HH-3) hemocitárias de *Pteria hirundo* expressos em unidades arbitrárias (U.A.).

Populações hemocitárias	FSC (U.A.)	SSC (U.A.)	% hemócitos
HG	659,45 ± 15,97	297 ± 6,6	9,4
HH-1	890,90 ± 14,77	210,13 ± 15,21	52,7
HH-2	630,63 ± 17,98	105,20 ± 45,82	23,5
HH-3	439,95 ± 34, 72	142,00 ± 20,90	12,0
CB	235 ± 3,2	79 ± 2,4	2,3

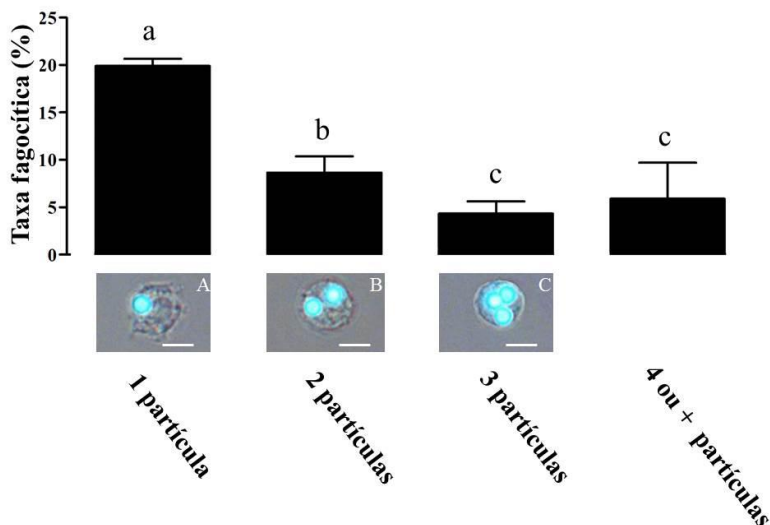
2.3.3 Caracterização funcional dos hemócitos

2.3.3.1 Determinação da capacidade fagocítica ex-vivo

Os ensaios de fagocitose foram realizados para investigar se os hemócitos de *P. hirundo* possuíam a capacidade de reconhecer e fagocitar partículas estranhas. Através das análises de citometria de fluxo, foi possível observar que os hemócitos de *P. hirundo* apresentaram uma alta taxa fagocítica ($38,5 \pm 2,9\%$) (**Figura 4**). Houve diferenças significativas na porcentagem de células em relação à quantidade de partículas endocitadas (ANOVA; $F=46,78$; $P=0,0000$).

Grande parte dos hemócitos fagocitou somente 1 ($20,1 \pm 0,6\%$) partícula (**Figura 4**), seguida de hemócitos que fagocitaram 2 partículas ($8,3 \pm 0,8\%$), enquanto que não houve diferenças da quantidade de hemócitos que fagocitaram 3 ($4,1 \pm 0,5\%$), 4 ou mais partículas ($5,9 \pm 1,4\%$). Este resultado demonstra que *P. hirundo* assim como outros bivalves, tem este mecanismo como um dos principais meios de defesa celular (**Figura 4**).

Figura 4: Fagocitose de partículas fluorescentes de látex pelos hemócitos de *Pteria hirundo*.



Porcentagem de hemócitos que fagocitaram 1, 2, 3 e 4 ou mais partículas de látex. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o número de partículas fagocitadas pelos hemócitos. As Micrografias de luz indicam hemócitos que fagocitaram (a) uma, (b) duas e (c) três partículas fluorescentes de látex. Barra = 5 μ m.

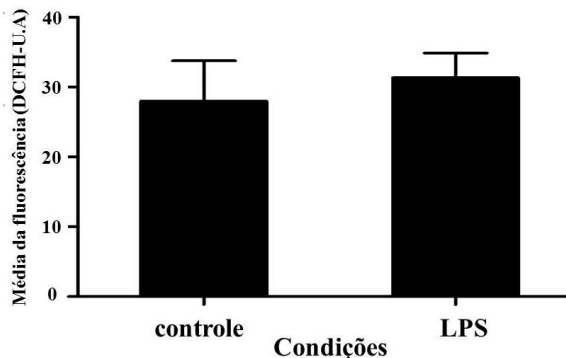
2.3.3.2 Produção *ex-vivo* de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Os ensaios de ERO foram realizados a fim de averiguar se os hemócitos de *P. hirundo* possuem a habilidade de produzir e liberar moléculas citotóxicas que auxiliam na morte e degradação de patógenos invasores. Os hemócitos de *P. hirundo* foram capazes de produzir ERO ($28 \pm 2,4$ U.A.), no entanto, o LPS não induziu um aumento ($31,3 \pm 3,5$ U.A.) significativo (ANOVA; $F=0,62$; $P=0,4508$) de um *burst* respiratório (**Figura 5**).

Foi possível analisar a produção de ERO para 3 populações de hemócitos que foram diferenciados por sua morfologia, HH-1, HH-3 e HG. A produção de ERO foi significativamente (ANOVA; $F=91,11$; $P=0,0000$) maior na subpopulação HH-1 ($45,5 \pm 3,2$ U.A., a) quando

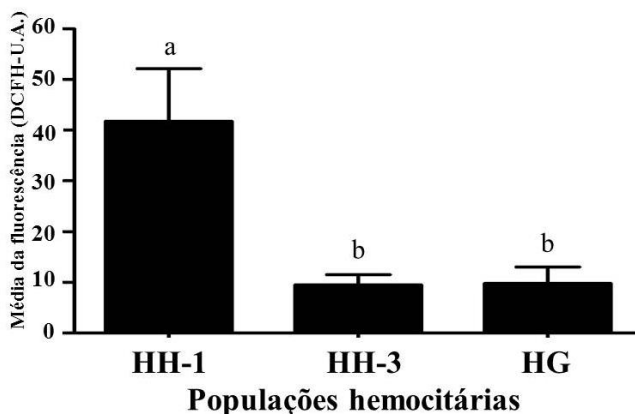
comparada a dos HG ($12,1 \pm 1,7$ U.A., b) e HH-3 ($9,2 \pm 0,6$ U.A., b) (Figura 6).

Figura 5: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos hemócitos da ostra *Pteria hirundo*.



Produção de ERO nos hemócitos do grupo controle (sem LPS, o indutor) e no grupo experimental (presença de LPS a $50 \mu\text{g/mL}$). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

Figura 6: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por cada uma das populações hemocitárias da ostra *Pteria hirundo*.

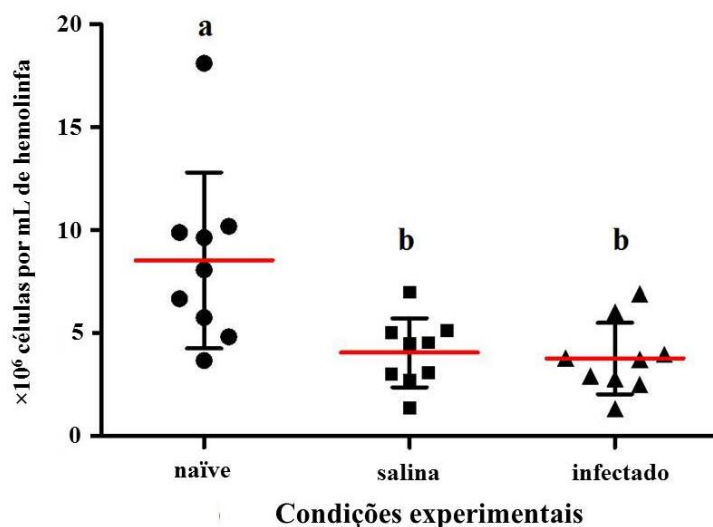


Produção de ERO nas subpopulações de hemócitos hialinos HH-1e HH-3 e população de hemócitos granulares (HG). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as populações hemocitárias.

2.3.3.3 Hemograma de ostras submetidas a um desafio bacteriano

O número total de hemócitos (THC) na hemolinfa de *P. hirundo* foi avaliada após uma infecção microbiana com a bactéria marinha *V. alginolyticus*. O número total de hemócitos nos animais não estimulados (*naïve*) foi de $8,53 \pm 4,27 \times 10^6$ células/mL, enquanto que nos animais injetados com veículo (salina) e *V. alginolyticus* foi de $4,05 \pm 1,66 \times 10^6$ e $3,77 \pm 1,73 \times 10^6$ células/mL, respectivamente (**Figura 7**). O hemograma de animais injetados com salina e infectados apresentaram o mesmo perfil, sendo 2 vezes inferior ($P < 0,05$) àqueles dos animais não manipulados (grupo *naïve*).

Figura 7: Contagem de hemócitos totais (THC) de *Pteria hirundo* após a injeção de PBS-salina (grupo Salina) ou após infecção com bactérias *V. alginolyticus* ATCC 17749



Animais não-manipulados foram utilizados como grupo controle (*naïve*). Os pontos representam os valores de THC dos diferentes indivíduos (n=9) de cada grupo experimental, enquanto que a linha em vermelho indica a média aritmética em cada grupo experimental. As letras indicam diferenças significativas entre as condições experimentais ($P < 0,05$).

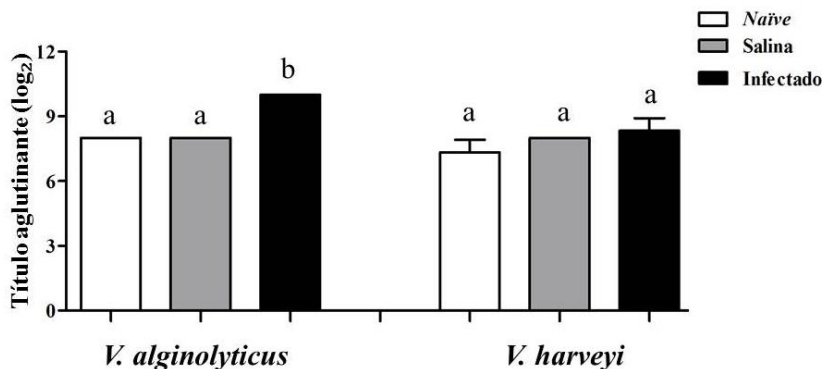
2.3.3.4 Avaliação da capacidade aglutinante do plasma após desafio bacteriano

Os ensaios de aglutinação foram realizados com hemolinfa total (plasma + conteúdo intracelular) proveniente de animais infectados ou não com *V. alginolyticus* (item 2.4.), com o objetivo de averiguar se haveria o reconhecimento e a aglutinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas marinhas. De maneira interessante, apenas as bactérias Gram-negativas *V. alginolyticus* ATCC 17749 e *V. harveyi* ATCC 14126 foram aglutinadas por componentes presentes na hemolinfa tanto de animais não estimulados (*naïve*), como animais injetados com salina ou infectados com *V. alginolyticus* (**Tabela 2**).

Em contrapartida, nenhuma das cepas bacterianas Gram-positivas testadas, *M. maritpicum* CPI 1057335 e *C. stationis* CPI 101282, foram aglutinadas. A hemolinfa incubada com as vibriónáceas revelaram diferentes títulos de aglutinação. A cepa *V. alginolyticus* foi fortemente aglutinada após incubação com a hemolinfa de animais infectados com esse mesmo agente infectante, registrando assim o maior título aglutinante ($\text{Log}_2=10$) (**Figura 8**), significativamente superior àquele registrados nos animais controle ($\text{Log}_2=8.0$) ($P<0,05$).

Curiosamente quando a hemolinfa foi incubada com a outra cepa Gram-negativa, *V. harveyi*, não se registrou nenhuma diferença significativa com o grupio infectado com *V. alginolyticus* ($\text{Log}_2=8.3$), ou animais controle (injetados com salina - $\text{Log}_2= 8$; animais *naïve*- $\text{Log}_2= 7,3$).

Figura 8: Capacidade aglutinante da hemolinfa de *P. hirundo* contra bactérias marinhas *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi*



As barras apresentam a média \pm DP da capacidade aglutinante de *pools* de 3 animais por tratamento (animais *naïve*, injetados com salina ou infectados com *V.alginolyticus*). As letras representam diferenças significativas ($P<0,05$) no título aglutinante entre os tratamentos.

2.4 DISCUSSÃO

Nos moluscos bivalves, a caracterização dos hemócitos e das populações hemocitárias é de extrema importância para avaliar a capacidade de defesa desses animais contra patógenos e situações de estresse ambiental (HÉGARET et al., 2003; CARELLA et al., 2015). A ostra perliífera nativa *Pteria hirundo* é uma espécie que possui um grande potencial para a maricultura devido a suas características zootécnicas e capacidade em produzir pérolas (ALBUQUERQUE et al., 2012).

O presente estudo visou caracterizar ultraestruturalmente os hemócitos da ostra perliífera *P. hirundo*, bem como identificar as suas populações hemocitárias e avaliar algumas das suas respostas celulares e humorais de defesa. Diferentes abordagens metodológicas foram aqui utilizadas, o que possibilitou a identificação em nível subcelular dos tipos de hemócitos e determinar a ocorrência de cada população hemocitária na hemolinfa deste bivalve e de algumas das atividades celulares funcionais relacionadas ao sistema imune.

A ideia mais aceita atualmente é de que existam, pelo menos, três tipos de hemócitos circulantes na hemolinfa dos moluscos bivalves, sendo eles: hemócitos hialinos (HH), hemócitos granulares (HG) e células blásticas (CB) ou *blast-like cells* (HINE, 1999; SUN et al., 2006;

ALADAILEH et. al, 2007). Em estudo preliminar, Vieira (2014) identificou apenas dois tipos hemócitários na hemolinfa de *P. hirundo*, os HH e os HG, por meio de técnicas de coloração e análises em microscopia de contraste de fase. Contudo, no presente estudo, análises ultraestruturais utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) possibilitaram a identificação de três tipos celulares, de forma semelhante ao descrito para a maioria dos bivalves: hemócitos hialinos (HH), hemócitos granulares (HG) e as células blásticas (CB). Estes três tipos celulares são encontrados também nas ostras *Crassostrea gigas* (BACHÈRE et. al., 1988), *Saccostrea glomerata* (ALADAILEH et al., 2007), *Crassostrea virginica* (FOLEY; CHENG, 1975), *Crassostrea ariakensis* (SUN, et. al, 2006), *Crassostrea gasar* (QUEIROGA et al., 2013) e *Crassostrea rhizophorae* (REBELO et al., 2013).

Curiosamente, a análise subcelular dos HG de *P. hirundo* revelou no citoplasma a presença de grânulos muito grandes e elétron-lúcidos. Esse achado diverge do comumente relatado para as ostras do gênero *Crassostrea*, *C. gigas* (BACHÈRE et al, 1988) e *C. rhizophorae* (REBELO et al., 2013), para outros pteriídeos estudados, como *Pinctada fucata* (LI et al., 2015) e *Pinctada imbricata* (KUCHEL et al., 2010), como também para o mitilídeo *Perna viridis* (WANG et al., 2012). Nesses outros bivalves, os HG apresentam tanto grânulos elétron-lúcidos, quanto elétron-densos. A estrutura dos grânulos elétron-lúcidos identificados em *P. hirundo* é, contudo, bastante similar daqueles encontrados em *P. viridis* (WANG et al., 2012) e *C. rhizophorae* (REBELO, et al., 2013).

Os grânulos são fundamentais para a classificação fisiológica e morfológica dos hemócitos (REBELO et al., 2013). Em estudos anteriores, foi demonstrado que os grânulos de hemócitos, incluindo os de ostras, podem ser ricos em peptídeos antimicrobianos e enzimas hidrolíticas (SONG et al., 2010; SCHMITT et al., 2012). Os grânulos que possuem proteínas normalmente aparecem elétron-densos em MET, enquanto que os que apresentam glicoproteínas/carboidratos ou lipídeos são visualizados mais elétron-lúcidos. A caracterização dos hemócitos e a identificação dos componentes dos grânulos pode ser auxiliada mediante o uso de diferentes métodos de coloração, como Giemsa, uma coloração diferencial baseada em características ácido-básicas, o ácido periódico-Schiff ou coloração PAS (do inglês, *Periodic acid-Schiff*), para identificar carboidratos (glicogênio, glicoproteína, proteoglicanos), o método de Gomori para detecção de fosfatases ácidas e o Sudan Black B para identificação de lipídeos (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Na ostra perliífera *P. imbricata* os HG corados com Giemsa apresentaram tanto hemócitos basófilos quanto eosinófilos (KUCHEL et

al., 2010). Em estudo anterior, os HG de *P. hirundo* corados com Giemsa apresentaram somente grânulos basófilos (VIEIRA, 2014), assim como descrito para os HG de outras espécies de bivalves, *Tridacna crocea* e *P. perna* (NAKAYAMA et al., 1997; BARRACCO et al., 1999).

No presente estudo não foi possível identificar carboidratos ou lipídeos nos grânulos dos HG de *P. hirundo*, utilizando as colorações de PAS e Sudan Black B, respectivamente (dados não apresentados). Esses resultados preliminares podem ser devido aos grânulos possuírem uma composição química complexa e diferenciada ou ainda, os componentes intra-granulares terem sido extraídos durante as etapas de fixação e inclusão celular em resina. Sabe-se que o uso de acetona, como a utilizada no presente estudo, é capaz de promover a extração de lipídeos intracelulares (BOZZOLA; RUSSEL, 1991). Sendo assim, novas análises deverão ser realizadas para elucidar essa questão.

É conhecido o fato de que os grânulos dos hemócitos de vários moluscos bivalves são particularmente ricos em peptídeos antimicrobianos e outras proteínas imunológicas que podem ser seletivamente ligados aos fagossomos ou liberados na hemolinfa, após um estímulo extracelular (ROSA et al., 2011; GANZ, 2003). Como mencionado anteriormente, a presença de proteínas confere aos grânulos hemocitários uma ultraestrutura elétron-densa. Por meio de ensaios preliminares de imunofluorescência indireta com os hemócitos de *P. hirundo* (dados não apresentados) foi possível detectar a presença de dois PAM, a mitilina, originalmente encontrada em *Mytilus galloprovincialis* (MITTA et al., 2000) e a defensina, descrita em *C. gigas* (CHARLET et al. 1996; HUBERT et al., 1996). Entretanto, não foi possível identificar em qual tipo hemocitário encontravam-se esses PAM. Esses achados, embora preliminares, apontam para a presença destes dois PAM nos hemócitos de *P. hirundo*, sugerindo a participação hemocitária na defesa antimicrobiana deste pterideo, o que merece ser melhor investigado no futuro.

O estresse crônico (ambiental ou infeccioso) pode ocasionar diferentes tipos de danos nas células dos bivalves podendo levar à morte celular por apoptose, necrose ou autofagia (*vide* revisão de (CARELLA et al., 2015). A presença de estruturas vesiculares do tipo autofagossomo foram recentemente descritas em hemócitos de *C. gigas* infectadas com OsHV-1 e *Vibrio aestuarianus*, demonstrando o processo de autofagia na defesa viral e bacteriana deste bivalve (MOREAU et al., 2015). Porém, esse parece não ser o caso dos HG de *P. hirundo*, uma vez que as análises ultraestruturais revelaram claramente a presença de uma membrana única envolvendo os grânulos citoplasmáticos, ao contrário dos autofagossomos

que possuem uma dupla membrana (CARELLA et al., 2015). Além disso, as vesículas observadas nos HG de *P. hirundo*, contudo, não se caracterizam como autofagossomos por não apresentarem componentes (material degradado) dentro dos grânulos como observado em *C. gigas* (MOREAU et al., 2015).

Em relação aos HH de *P. hirundo*, as análises ultraestruturais revelaram um núcleo com heterocromatina, um citosol rico em estruturas vesiculares, mitocôndrias e outras organelas. A grande quantidade de mitocôndrias pode sugerir que essas sejam células muito ativas e necessitam de uma grande quantidade de ATP para a realização de suas atividades como a fagocitose e a produção de ERO conforme demonstrado no presente trabalho. Outras espécies de moluscos bivalves como *S. glomerata* (ALADAILEH et al., 2007), *P. fucata* (LI et al., 2015) e *P. viridis* (WANG et al., 2012) apresentaram características semelhantes às das HH de *P. hirundo*. Por fim, as análises subcelulares das células blásticas (CB) de *P. hirundo* revelaram uma alta relação núcleo/citoplasma, com a presença de um núcleo volumoso ocupando quase todo o citoplasma. Estas células possuem uma alta taxa núcleo/citoplasma e apresentam ribossomos livres no citoplasma, sugerindo que estas poderiam ser potenciais células precursoras de outros tipos celulares (SCHMITT et al., 2011). Alguns estudos sugerem ainda que as CB sejam as precursoras dos HH, uma vez que apresentam uma porção do citoplasma altamente basófila, com ribossomos livres e sugerindo imaturidade celular, além de possuírem características morfológicas mais semelhantes aos HH (RUSSELL-PINTO et al., 1994; WEN et al., 1994; CARBALLAL et al., 1997 a; REBELO et al., 2013). No entanto, ainda não se sabe se os granulócitos e hialinócitos derivam destas células blásticas (SCHMITT et al., 2011).

Em estudo recente, Rebelo e colaboradores (2013) sugerem um modelo de diferenciação dos hemócitos para a ostra *C. rhizophorae* baseado em características morfológicas, de volume e complexidade interna celular, por citometria-de-fluxo. Neste caso, os autores sugerem que as células blásticas iniciariam o processo de diferenciação celular aumentando a quantidade de organelas em seu citoplasma para que se tornem hemócitos hialinos maiores. Posteriormente, os hemócitos hialinos desenvolveriam vesículas, aumentando seu tamanho e complexidade interna, e assim tornando-se hemócitos granulares. Por fim, os hemócitos granulares poderiam excitar seus grânulos, por meio de estímulos extracelulares, conservando seu tamanho, porém diminuindo sua complexidade interna. Essa hipótese carece, contudo, de fundamentos

teóricos (além de outros experimentais) que a suportem e estudos mais aprofundados são necessários.

Além da ausência de clareza no que se refere à classificação dos hemócitos dos moluscos bivalves, outra limitação é que, dependendo da fase de maturação ou das atividades funcionais de um tipo de célula, a morfologia celular e características físico-químicas podem ser alteradas, como por exemplo, a complexidade interna de fagócitos profissionais aumenta durante o processo de fagocitose, quando analisados por citometria de fluxo (BACHÉRE et al., 2015). Sendo assim, as diferentes hipóteses a respeito dos tipos hemocitários devem ser interpretadas com cautela.

As análises ultraestruturais para a identificação dos tipos hemocitários de *P. hirundo* foram complementadas com análises de citometria de fluxo, onde três diferentes populações de hemócitos (HG, HH e CB) foram encontradas, considerando o tamanho celular *versus* a complexidade intracelular. De maneira interessante, três subpopulações foram encontradas na população de hialinos: HH-1, HH-2 e HH-3, possuindo complexidades internas semelhantes, porém volumes celulares diferenciados. A espécie *P. imbricata* apresenta duas subpopulações de HH (KUCHEL et al., 2010). A espécie *S. glomerata* (ALADAILEH et al., 2007) apresenta duas subpopulações de HH, e *P. viridis* (WANG, et al., 2012) demonstra três subpopulações de HG. A presença de subpopulações de HH em bivalves pode estar associada a diferentes estágios de maturação celular.

Para compreender o sistema imune dos moluscos, além de caracterizar suas células imunocompetentes é importante também quantificá-las com o intuito de obter uma compreensão do seu estado geral de saúde. Em moluscos bivalves, a contagem total e diferencial de hemócitos (THC e DHC, respectivamente) pode apresentar uma ampla variação, tanto entre indivíduos, como entre espécies como demonstrado na **Figura 9**, o que reflete diversos estados fisiológicos dos animais na presença de patógenos (CHU; LA PEYRE 1993, OUBELLA et al. 1993, COLES et al. 1995, JONES et al. 1995, PIPE et al. 1995, FISHER et al. 1996). Os hemogramas têm sido utilizados para monitorar o estado de saúde dos animais em presença de agentes infecciosos e também servem como imunoparâmetros que indicam contaminação ambiental (VARGAS-ALBORES; BARRACO, 2001). O número de hemócitos totais de espécimes sadios de *P. hirundo* ($8,5 \times 10^6$ céls/mL) (**Figura 9**) foi semelhante ao encontrado em outros bivalves, como no mexilhão *M. edulis* (8×10^6 céls/mL; COLES et al., 1995) e no mexilhões *Chlamys farreri* ($7,4 \times 10^6$ céls/mL; LIU et al., 2004). A quantificação das

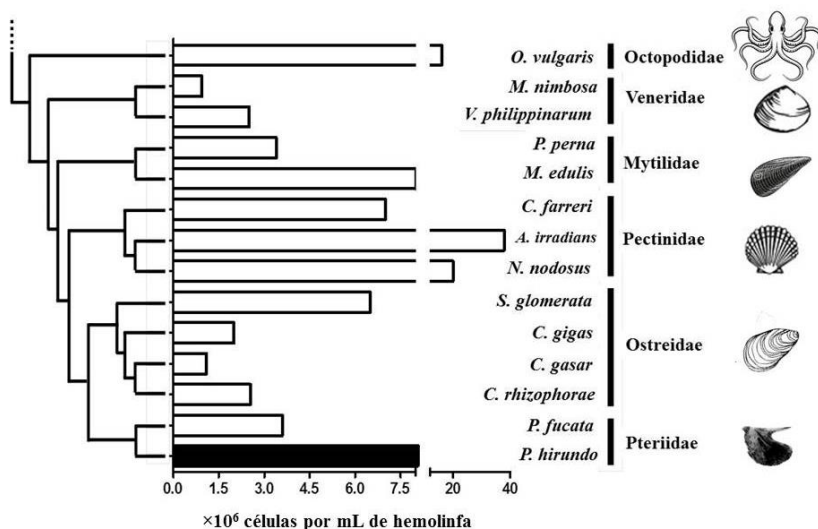
populações hemocitárias na hemolinfa de *P. hirundo* por citometria de fluxo demonstrou que HH representaram a população mais abundante na hemolinfa de *P. hirundo* (88,2%), seguido pelos HG (9,4%) e pelas CB (2,4%). Outras espécies de moluscos bivalves também apresentam uma maior quantidade de HH, que representam de 63% a 78% dos hemócitos, os HG representam de 12 a 30% e as CB representam os hemócitos geralmente são mais raros na hemolinfa podendo representar de 3,8% a 5% (REBELO et al., 2013; HÉGARET et al., 2003 a). Por fim a ostra perlífera *P. fucata* onde os HH constituíram 78,23%, os HG 12,22% e CB 9,32% (LI et al., 2015), estes resultados se assemelham aos encontrados em *P. hirundo*.

Após caracterizar morfológicamente, ultraestruturalmente e identificar as populações hemocitárias de *P. hirundo*, outro objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade imunofuncional dos hemócitos, por meio de análises de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e capacidade de reconhecimento e aglutinação de bactérias. Sabe-se que quando o hospedeiro é invadido por microrganismos, os hemócitos migram massivamente através dos tecidos para os sítios de infecção, gerando diferentes respostas imunológicas (ROSA et al., 2011). Nesses sítios, as células circulantes da hemolinfa possuem a capacidade de reconhecer, interiorizar e degradar partículas estranhas. As células imunocompetentes de *P. hirundo* demonstraram essa habilidade *ex vivo*, fagocitando partículas inertes fluorescentes de látex, com uma alta taxa fagocítica (cerca 40%), igual ao encontrado na ameijão *Ruditapes decussatus* (PRADO-ALVAREZ et al., 2012). Em contrapartida, os hemócitos das espécies *P. viridis*, *C. virginica* e *C. gasar* apresentaram uma taxa fagocítica inferior, de 25,7%, 20-25% e 15,8%, respectivamente (DONAGHY; VOLETY, 2011; HÉGARET et al., 2003 b; QUEIROGA et al., 2013). Logo, a taxa fagocítica dos hemócitos de *P. hirundo* pode ser considerada elevada quando comparada àquela da maioria dos bivalves estudados.

A fagocitose é um mecanismo de defesa celular muito importante e a proporção e o tipo de hemócito fagociticamente ativo fornece informações relevantes sobre o estado imunológico dos animais (ELLIS et al., 2011). No presente estudo não foi possível realizar fagocitose com microrganismos, nem determinar qual(ais) o(s) tipo (s) hemocitário(s) é responsável pela atividade fagocítica. Contudo, sabe-se que em ostras *C. gigas*, os HG e os maiores HH grandes os fagócitos profissionais (SCHMITT et al., 2011), destacando-se por outro lado os HG como os mais fagócitos nas espécies *P. imbricata*, *C. virginica* e *P. viridis* (SONG

et al., 2010; KUCHEL et al., 2010; HÉGARET, et al., 2003b; DONAGHY; VOLETY, 2011).

Figura 9: Número de hemócitos circulantes na hemolinfa de diferentes espécies de moluscos.



O nome das espécies (com a indicação das famílias) está representado à direita: *Pteria hirundo*, *Pinctada fucata* (DANG et al., 2012), *Crassostrea rhizophorae* (BARTH et al., 2003), *C. gasar* (QUEIROGA et al., 2013), *C. gigas* (ZHANG et al., 2014), *Saccostrea glomerata* (DANG et al., 2014), *Nodipecten nodosus* (SCHLEDER et al., 2008), *Argopecten irradians* (ZHANG et al., 2006), *Chlamys farreri* (LIU et al., 2004), *Mytilus edulis* (COLES et al., 1995), *Perna perna* (BARRACCO et al., 1999), *Venerupis (Ruditapes) philippinarum* (OUBELLA et al., 1996), *Macrocallista nimbosea* (JAUZEIN et al., 2013) e *Octopus vulgaris* (CASTELLANOS-MARTÍNEZ et al., 2014). O dendograma à esquerda indica a relação filogenética entre as espécies (PLAZZI et al., 2011).

Após a confirmação de que os hemócitos de *P. hirundo* possuíam a capacidade de endocitar partículas não próprias, outra pergunta importante do presente trabalho foi se essas células eram capazes de produzir ERO. Espécies reativas de oxigênio são importantes compostos produzidos e liberados pelos hemócitos durante o processo fagocítico, que auxiliam a destruição dos microrganismos (ADEMA et al., 1991; TERAHARA; TAKAHASHI, 2008). A utilização da citometria de fluxo,

juntamente com o corante DCFH-DA, permitiu constatar a presença da atividade oxidativa nos hemócitos de *P. hirundo*, como ocorre em outras espécies bivalves, incluindo *C. virginica*, *C. gigas*, *M. mercenaria* e *R. philippinarum* (GOEDKEN; DE GUISE, 2004; HÉGARET et al., 2003b; LABREUCHE et al., 2006 b; LAMBERT et al., 2003; BUGGÉ et al., 2007). O indutor de *burst* respiratório, o LPS (componente da superfície de bactérias Gram-negativas), não foi capaz de induzir um aumento significativo na produção de ERO pelos hemócitos de *P. hirundo*. Este fato pode estar relacionado à concentração inadequada do indutor aqui utilizada, que foi escolhida por induzir a produção de ERO pelos hemócitos de camarões (GUERTLER et al., 2010).

O nível de produção ERO basal variou entre as diferentes populações de hemócitos, sendo as subpopulação de maior produção foi a HH-1, são as células mais ativas em *P. hirundo* na produção deste componente antimicrobiano. Esse resultado difere do descrito em *C. Virginica*, *C. ariakensis* e *M. mercenaria* (HÉGARET et al., 2003b; DONAGHY et al., 2009; BUGGÉ et al., 2007), onde os HG são as células que mais produzem ERO. Embora sua composição e função possam variar consideravelmente, os HG são capazes de fagocitar ativamente microrganismos, gerar ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e sintetizar proteínas de reconhecimento padrão, enzimas digestivas e PAM (SCHMITT et al., 2012; BARRACCO; DA SILVA, 2008). Os resultados do presente trabalho demonstram, contudo, que os HH de *P. hirundo* possuem uma importante contribuição para a defesa antimicrobiana via produção de moléculas citotóxicas, como os ERO.

Como citado anteriormente, os hemogramas têm sido utilizados para monitorar o estado de saúde dos animais podendo indicar a presença de agentes infecciosos. Dentro deste contexto, os hemogramas foram utilizados para averiguar a atuação dos hemócitos de *P. hirundo* frente a uma infecção bacteriana. Uma queda significativa no número de hemócitos totais circulantes foi observada 24 h após da injeção dos bivalves com *V. alginolyticus* ou salina (controle). A injúria causada pela agulha, por si só, promoveu uma resposta celular inespecífica independente da presença do microrganismo, sendo que hemócitos deixaram a hemolinfa e migraram para o sítio da injeção, causando redução na THC. Fenômeno semelhante já foi relatado em ostras *C. gigas* (SCHMITT et al., 2012; Rosa et al., 2011). Portanto, o agente infeccioso não causou alteração da THC.

Outras moléculas importantes para a imunidade dos moluscos são as lectinas que são glicoproteínas do tipo aglutininas, sem atividade catalítica e que se liga a carboidratos específicos da superfície de

diferentes células, incluindo microrganismos, causando a sua aglutinação (ALLAN; RAFTOS, 2015). Usualmente, a presença de lectinas é detectada através de ensaios de aglutinação onde o plasma é incubado com eritrócitos de diferentes vertebrados. No presente estudo, a utilização de bactérias marinhas ao invés de eritrócitos nos ensaios de aglutinação fornecem resultados mais compatíveis às reais respostas imunológicas do bivalve frente a um patógeno de ocorrência natural em seu ambiente. As lectinas são moléculas que podem estar livre na hemolinfa, distribuídas no citoplasma ou associadas à membrana plasmática dos hemócitos (WANG et al., 2011). No presente estudo, os ensaios de aglutinação foram realizados com plasma acrescido do conteúdo intracelular (= hemolinfa total). Apenas as bactérias Gram-negativas *V. alginolyticus* e *V. harveyi* foram reconhecidas e aglutinadas por aglutininas/lectinas presentes na hemolinfa de *P. hirundo*. Nenhuma das bactérias Gram-positivas testadas (*M. maritipicum* e *C. stationis*) foram aglutinadas, o que sugere que não foram reconhecidas. A aglutinação observada somente das vibrionáceas representa um importante resultado, pois indica que ostras *P. hirundo* possuem PRPs contra esses patógenos oportunistas, que mediante imunossupressão dos bivalves podem causar enfermidades.

Na literatura, estudos que analisam a diversidade, distribuição e quantidade de bactérias marinhas associadas aos moluscos bivalves são limitados. Estes estudos, datados na década de 60, apresentam resultados que coincidem com predominância de bactérias Gram-negativas no organismo dos moluscos, especialmente as do gênero *Vibrio* (COLWELL; LISTON, 1960; BEENSON; JOHNSON, 1967; KUEH; CHAN, 1985). Várias espécies de vibrionáceas estão associadas a organismos marinhos como peixes, moluscos e crustáceos, fazendo parte da sua microbiota endobionte ou causando enfermidades em determinadas condições estressoras (ROMALDE et al., 2014). Nos ensaios de aglutinação com *V. alginolyticus*, houve um aumento significativo no título aglutinante da hemolinfa de animais infectados, em relação aos animais injetados com salina ou *naïve*. Este resultado sugere um estímulo na produção de aglutininas/lectinas que reconhecem vibrionáceas, advindo da infecção por *V. alginolyticus*, uma vez que os vibrios utilizados tanto na infecção quanto nos testes da aglutinação foram os mesmos. A bactéria *V. harveyi* também foi reconhecida pela hemolinfa de *P. hirundo*, porém não houve produção diferencial de aglutininas/lectinas em resposta a infecção com *V. alginolyticus*.

2.5 CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo revelou que a hemolinfa de *P. hirundo* possui três populações de hemócitos, representadas por hemócitos hialinos (HH), hemócitos granulares (HG) e células blásticas (CB). A população mais abundante na circulação foi a de hemócitos hialinos (88,2%), seguida pelos granulares (9,4%) e células blásticas (2,4%). Três diferentes subpopulações de HH foram identificadas (HH-1, HH-2 e HH-3). Os hemócitos apresentaram a habilidade de fagocitar partículas inertes (38,5% dos hemócitos avaliados) e produzir ERO com ou sem a indução por LPS bacteriano. Os principais produtores deste composto microbicida foram as subpopulações HH-1 e HH-3 de hemócitos hialinos e os HG. A presença de moléculas aglutinantes na hemolinfa de ostras previamente desafiadas com a *V. alginolyticus* foi demonstrada por meio da aglutinação *in vitro* dos vibrios marinhos, *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, porém as bactérias marinhas Gram-positivas *M. maritypicum* e *C. stationis* não foram aglutinadas. O número total de hemócitos circulantes em ostras aparentemente saudáveis foi de $8,53 \pm 4,27 \times 10^6$ células/mL, no entanto após a injeção com *V. alginolyticus* ou salina, este número diminuiu 2×. Estes resultados demonstraram que esta espécie possui os mecanismos de defesa relatados em outros bivalves.

2.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de mestrado de Graziela Cleuza Vieira, e pelo financiamento através do projeto CIMAR 1974/2014, ao LAMEB e LCME (UFSC) pelos equipamentos utilizados nesse estudo.

2.7 REFERÊNCIAS

ADEMA C. M.; VAN DER KNAAP W. P. W.; SMINIA T. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: The role of reactive oxygen intermediates. **Reviews in Aquatic Science**, v. 4, p. 201-223, 1991.

ALADAILEH S. et al. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. **Journal of invertebrate pathology**, v. 96, n. 1, p. 48-63, set. 2007.

ALBUQUERQUE M. et al. Growth and survival of the pearl oyster *Pteria hirundo* (L.1758) in an intermediate stage of culture in Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 175–180, 2012.

ALLAM B.; RAFTOS D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 121–36, out. 2015.

BACHÈRE E. et al. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 1, p. 50–64, set. 2015.

BACHÈRE E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149–168, 2004.

BACHÈRE E.; CHAGOT D.; GRIZEL H. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 12, p. 549–559, 1988.

BARBOSA SOLOMIEU, V.; RENAULT, T.; TRAVERS, M. A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 2–10, 2015.

BARRACCO M. A.; PERAZZOLO L.M.; ROSA R. D. **Avances en la inmunologia del camarón**, 2014.

BARRACCO M.A.; DA SILVA P.M. Hemolinfa e sistema imune do mexilhão *Perna perna*, 2008.

BARRACCO M.A.; MEDEIORS I.D.; MOREIRA F.M. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 387–404, 1999.

BARTH T. ; MORAES N. ; BARRACCO M. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. **Aquatic Living Resources**, v. 18, p. 179–186, 2005.

BEENSON R. J.; JOHNSON P. T. Natural bacterial flora of the bean clam, *Donax gouldi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 104–110, 1967.

BOZZOLA J.J.; RUSSEL. L.D. Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists. Ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1992.

BUGGÉ D. M.; HÉGARET H.; WIKFORS G. H.; ALLAM B. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. **Fish & shellfish immunology**, v. 23, p. 188–96, 2007.

CARBALLAL M. J.; LOPEZ C.; AZEVEDO C.; VILLALBA A. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. **Fish & shellfish immunology**, v. 7, p.403–416, 1997a.

CARELLA, F. et al. Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 107–20, out. 2015.

CASTELLANOS-MARTÍNEZ, S. et al. Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. **Developmental and comparative immunology**, v. 44, n. 1, p. 50–8, maio 2014.

CHARLET M.; CHERNYSH S.; PHILIPPE H.; HETRU C.; HOFFMANN J.A.; BULET P. Innate immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 21808–21813, 1996.

CHENG T. C. Bivalves. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), **Invertebrate Blood Cells**, p. 233–300. Academic Press London, 1981.

CHU F.L.E; LAPEYRE J. F. Development of disease caused by the parasite, *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in 3 populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. **Shelf Research Journal**, v. 12, p. 21–27, 1993.

COLES J. A.; FARLEY S.R.; PIPE R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from

exposure to cádmium. **Inter-Research Diases of Aquatic Organisms**, v. 22, p- 59-65, 1995.

COLWELL R. R.; LISTON J. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 8, p. 104–109, 1960.

DANG C.; TAN T.; MOFFIT D.; DEBOUTTEVILLE J. D.; BARNES A. C. Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, p. 138-142, 2012.

DANG C.; et al. Immune parameters of QX-resistant and wild caught *Saccostrea glomerata* hemocytes in relation to *Marteilia sydneyi* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, p. 1034-1040, 2011.

DONAGHY L.; VOLETY A. K. Fish & Shellfish Immunology Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis* : in vitro impacts of temperature. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 808–814, 2011.

DONAGHY L. et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 296–301, 2009.

ELLIS R. P. et al. Fish & Shellfish Immunology Immunological function in marine invertebrates : Responses to environmental perturbation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 6, p. 1209–1222, 2011.

ELSTON R.A.; HASEGAWA H.; HUMPHREY K.L.; POLYAK I.K.; HASE C.C. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. **Diseases of Aquatic Organisms**.v. 82, p. 119–134, 2008.

ENGELMANN, P.; COOPER, E. L.; NÉMETH, P. Anticipating innate immunity without a Toll. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 8, p. 931–942, 2005.

FAWCETT D. W. Cytoplasmic inclusions. London, Toronto, W.B. Saunders Co. Philadelphia. **The Cell**. p. 641–741, 1981a.

FISHER W. S.; OLIVER L. M.; EDWARDS P. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida Continental **Shelf Research Journal**, v. 15, p. 555-564, 1996.

FOLEY D. A.; CHENG T. C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 25, p. 189-187, 1975.

GANZ T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p.710–720, 2003.

GOEDKEN, M.; DE GUISE, S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. **Fish & shellfish immunology**, v. 16, n. 4, p. 539–52, abr. 2004.

GUERTLER C. Defesa antiviral em *Litopenaeus vannamei* contra o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), induzida via RNA de interferência, e sua influência na expressão de alguns genes imunológicos, p. 103. **Dissertação de Mestrado em Aquicultura**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, n. 2, p. 249–265, set. 2003.

HÉGARET H., WIKFORS G.H.; SOUDANT P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p. 237–265, 2003a.

HÉGARET H., WIKFORS G.H., SOUDANT P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p. 237–248, 2003b.

HINE, P. The inter-relationships of bivalve haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 5, p. 367–385, 1999.

HUBERT F.; NOEL T.; ROCH P. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Eur J Biochem**, v. 240, p. 302-306, 1996.

JAUZEIN C.; DONAGHY L.; VOLETY A. K. Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray venus clam *Macrocallista nimbosa* and influence of salinity variation. **Fish and Shellfish Immunology**, v.35, p.716-24, 2013.

JONES T.O.; WHYTE J. N. C.; GINTHER , N.G.; TOWN- SEND L.D.; IWAMA G.K. Haemocyte changes in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, caused by exposure to domoic acid in the diatom *Pseudonitzschia pungens* F multiseres. **Toxicon** v. 33, p. 347-353, 1995.

KUCHEL, R. P. et al. Haemocyte morphology and function in the Akoya pearl oyster, *Pinctada imbricata*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 105, n. 1, p. 36–48, set. 2010.

KUEH C. S. W.; CHAN K. Y. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 41–47, 1985.

LABREUCHE Y.; SOUDANT P.; GONCALVES M.; LAMBERT C.; AND NICOLAS J. L. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. Developmental and Comparative. **Immunology**, v. 30, p. 367–379, 2006b.

LAMBERT C.; SOUDANT P.; CHOQUET G.; PAILLARD C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. **Fish & shellfish immunology**, v. 15, p. 225-40, 2003.

LI, S. et al. Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming. **Fish & shellfish immunology**, v. 45, n. 1, p. 194–202, jul. 2015.

LIU S.; JIANG X.; HU X.; GONG J.; HWANG H.; MAI K. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two Scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 678-682, 2004.

MITTA G. et al. Mytilin B and MGD2 , two antimicrobial peptides of marine mussels : gene structure and expression analysis. v. 24, p. 381–393, 2000.

MOREAU P.; MOREAU K.; SEGARRA A.; TOURBIEZ D.; TRAVERS M.; RUBINSZTEIN C.; RENAULT T. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infection. **Autophagy**. v.11:3, p. 516-526, 2015.

MUTA T. Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1 -> 3)-beta-D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern. **Current Pharmaceutical Design**, v. 32, p. 4155-4161, 2006.

NAKAYAMA K.; NOMOTO A.M.; NISHIJIMA M.; MARUYAMA T. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 69, p.105–111, 1997.

OUBELLA R.; MAES P.; BASSEM A.; PAILLARD C.; AUFFRET M. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). **Aquatic Living Resources**, v. 9, p. 137-143, 1996.

PIPE R. K.; COLES J. A.; THOMAS M. E.; FOSSATO V. U.; PULSFORD A.L. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. **Aquatic Toxicology**. v. 32, p. 59-73, 1995.

PLAZZI F.; CEREGATO A.; TAVIANI M.; PASSAMONTI M. A molecular phylogeny of bivalve mollusks: ancient radiations and divergences as revealed by mitochondrial genes. **PLoS One**, v. 6, 2011.

PRADO-ALVAREZ M. et al. Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 1, p. 69–78, jan. 2012.

QUEIROGA F. R. et al. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson , 1757) in Northeast Brazil. p. 756–766, 2015.

REBELO, M. D. F. et al. New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57384, jan. 2013.

ROMALDE J. L. et al. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. January, p. 413, 2014.

ROSA R. D. et al. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25594, jan. 2011.

RUSSELL-PINTO F.; REIMAO R.; DE SOUSA M. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, p. 383–397, 1994.

RUWANDEEPIKA H. A. D.; JAYAWEERA P. S.; BHOWMICK P. P.; KURANAGASAR I.; BOSSIER P.; DEFROIDT T.; Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 59–74, 2012.

SAULNIER D.; DE DECKER S.; HAFFNER P.; COBRET, L.; ROBERT M.; GARCIA, C. A large- scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. **Microbial Ecology**, v. 59, p. 787–798, 2010.

SAWABE, T. et al. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. DEC, p. 1–14, 2013.

SCHLEDER, D. D. et al. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 256–263, ago. 2008.

SCHMITT P.; MONTAGNANI C.; BACHÈRE E.; DESTOUMIEUX-GARZÓN D. Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*:

An overview with focus on summer mortalities. **Nova Science Publishers**, c. 9, 2011.

SCHMITT, P. et al. Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 37, n. 3-4, p. 363–370, 2012.

SONG, X. et al. An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 2, p. 326–332, 2010.

SUN J. C.; UGOLINI S.; VIVIER E. Immunological memory within the innate immune system. **The EMBO journal**, v. 33, n. 12, p. 1295–303, 17 jun. 2014.

SUN J.; WU X.; ZHANG W. Morphological, structural and functional characteristics of the hemocytes of the oyster, *Crassostrea ariakensis*. **Journal of Shellfish Research**, v. 25, p. 55–64, 2006.

SPURR A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, p. 31–43, 1969.

TERAHARA K.; TAKAHASHI K., Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. **Current Pharmaceutical Design** v. 14, p. 131–137, 2008.

THOMPSON F. L.; IIDA T.; SWINGS J. Biodiversity of Vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p.403–431, 2004.

URBAN H. J. Culture potential of the pearl oyster (*Pinctada imbricata*) from the Caribbean. II. Spat collection, and growth and mortality in culture systems. **Aquaculture**, v. 189, n. 3-4, p. 375–388, 2000.

VARGAS-ALBORES F.; BARRACCO M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. In: Maeda-Martínez, A.N. (Ed), **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. Limusa, La Paz, p.127-14, 2001.

VIEIRA G. C. Caracterização preliminar dos hemócitos da perlífera nativa *Pteria hirundo* **Trabalho de Conclusão de Curso**. Engenharia de Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

VILLALBA, A. et al. Perkinsosis in molluscs : A review. v. 432, p. 411–432, 2004.

WANG, Y. et al. Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*. **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 3, p. 381–90, mar. 2012.

WANG D.; et al. Genome sequencing reveals unique mutations in characteristic metabolic pathways and the transfer of virulence genes between *V. mimicus* and *V. cholerae*. **PLoS One**, v. 6, e21299, 2011.

WEN C. M.; KOU G. H.; CHEN S. N. Light and electron microscopy of hemocyte of the hard clam, *Meretrix lusoria* (Röding). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 108A, p. 279–286, 1994.

ZHANG T.; QIU L.; SUN Z.; WANG L.; ZHOU Z.; LIU R.; YUE F.; SUN R.; SONG L. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 45, p. 141-150, 2014.

3. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABELE D.; PUNTARULO S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004.

ABBOTT R.T. **American Seashells**. New York: Van Nostrand Reinhold, 587 p, 1974.

ACEB-Associação Cultural e Educacional brasil - **Primeiro anuário Brasileiro de Pesca e Aquicultura 2014**.

ADEMA C. M.; VAN DER KNAAP W. P. W.; SMINIA T. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: The role of reactive oxygen intermediates. **Reviews in Aquatic Science**, v. 4, p. 201-223, 1991.

ALADAILEH S. et al. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. **Journal of invertebrate pathology**, v. 96, n. 1, p. 48–63, set. 2007.

ALBUQUERQUE M.C.P. Novas opções de cultivo de moluscos bivalves marinhos no Brasil: *Pteria hirundo* (Linnaeus, 1758) e *Cyrtopleura costata* (Linnaeus, 1758), p. 218. **Tese de doutorado em Aquicultura**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

ALBUQUERQUE M. et al. Growth and survival of the pearl oyster *Pteria hirundo* (L.1758) in an intermediate stage of culture in Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 175–180, 2012.

ALLAM B.; RAFTOS D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 121–36, out. 2015.

AMEND A. S.; et al. Macroecological patterns of marine bacteria on a global scale. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 800–811, Nov. 2012.

BACHÈRE E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149–168, 2004.

BACHÈRE E. et al. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 1, p. 50–64, set. 2015.

BACHÈRE E.; HERVIO D.; MIALHE, E. Lumhol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* . **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 11, p. 173–180, 1991.

BACHÈRE E.; CHAGOT D.; GRIZEL H. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 12, p. 549-559, 1988.

BARBOSA SOLOMIEU, V.; RENAULT, T.; TRAVERS, M. A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 2–10, 2015.

BARRACCO M.A.; DA SILVA P.M. Hemolinfa e sistema imune do mexilhão *Perna perna*, 2008.

BARRACCO M.A.; MEDEIORS I.D.; MOREIRA F.M. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 387–404, 1999.

BARRACCO M. A.; PERAZZOLO L.M.; ROSA R. D. Avances en la inmunologia del camarón, 2014.

BARTH T. ; MORAES N. ; BARRACCO M. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. **Aquatic Living Resources**, v. 18, p. 179-186, 2005.

BAYNE C. Molluscan immunobiology. In: Saleuddin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), **The Mollusca. Academic Press**, p. 408–486. San Diego, 1983.

BEÇAK W.; PAULETE J. Técnicas de citologia e histologia. **Livros técnicos e científicos**, v. 1, 327 p, Rio de Janeiro, 1976.

BRANDÃO R.P.; BOEHS G.; SABRY R.C.; CEUTA L.O.; LUZ MDOS S.; QUEIROGA F.R.; DA SILVA P.M. *Perkinsus sp.* infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. Journal of Invertebrate Pathology (Print). **Journal of Invertebrate Pathology** . v. 112, p. 138-141, 2013.

BEENSON R. J.; JOHNSON P. T. Natural bacterial flora of the bean clam, *Donax gouldi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 104–110, 1967.

BREITBART, M. Marine Viruses: Truth or Dare. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, n. 1, p. 425–448, 2012.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64–76, 2000.

BOUZON Z.L.; OURIQUES L.C.; OLIVEIRA E.C. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (*Rhodophyta*, *Gelidiales*). **Journal of Applied Phycology**. v.18, p. 287-294, 2006.

BOZZOLA J.J.; RUSSEL. L.D. Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists. Ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1992.

BRINKMANN V.; REICHARD U.; GOOSMANN C.; FAULER B.; UHLEMANN Y.; WEISS D.S. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v.303, p. 1532-1535, 2004.

BUGGÉ D. M.; HÉGARET H.; WIKFORS G. H.; ALLAM B. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. **Fish & shellfish immunology**, v. 23, p. 188–96, 2007.

BURRESON E. M.; RAGONE-CALVO L. M. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake bay, with emphasis on data since 1985. **Journal of shellfish research**, v. 15, p. 17–34, 1996.

CAI J. et al. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased postlarval abalone, *Haliotis diversicolor* supertexta (Lischke). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 12, p. 1222–1226, 2006.

CARBALLAL M. J.; LOPEZ C.; AZEVEDO C.; VILLALBA A. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. **Fish & shellfish immunology**. v. 7, p.403–416, 1997a.

CARBALLAL M. J.; LÓPEZ, M. C.; AZEVEDO C.; VILLALBA A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 29, p. 127–135, 1997a.
Cells, p. 233–300. Academic Press London, 1981.

CARELLA, F. et al. Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 107–20, out. 2015.

CASTELLANOS-MARTÍNEZ, S. et al. Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. **Developmental and comparative immunology**, v. 44, n. 1, p. 50–8, maio 2014.

CASTILLO M. G.; SALAZAR, K. A.; JOFFE, N. R. The immune response of cephalopods from head to foot. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 145–160, 2015.

CERENIUS L.; SÖDERHÄLL, K. Variable immune molecules in invertebrates. v. 4, p. 4313–4319, 2013.

CHARLET M.; CHERNYSH S.; PHILIPPE H.; HETRU C.; HOFFMANN J.A.; BULET P. Innate immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 21808-21813, 1996.

CHEN J.; XIAO, S.; YU Z. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 2, p. 750–754, 2011.

CHENG T. C. Hemocytes: forms and functions, in The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. eds V. S. Kennedy, R. I. E. Newell, and A. E. Eble. **College Park, MD: Sea Grant College, University Of Maryland**, p. 299–333, 1996.

CHENG T. C. Bivalves. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), **Invertebrate Blood Cells**, p. 233–300. Academic Press London, 1981.

CHOI K; PARK K. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. In: Ishimatsu A, editor. Coastal environmental and ecosystem issues of the East China sea. **TERRAPUB and Nagasaki University**, p. 269 e 81. 2010.

CHU F.L.E; LAPEYRE J. F. Development of disease caused by the parasite, *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in 3 populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. **Shell Research Journal**, v. 12, p. 21-27, 1993.

CHU F.L.E. Humoral defense factors in marine bivalves. **American Fisheries Society**, v. 18, p. 178–188, 1988.

CIMA F. et al. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. **Fish & shellfish immunology**, v. 10, n. 8, p. 677–693, 2000.

COLES J. A.; FARLEY S.R.; PIPE R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cádmium. **Inter-Research Diasies of Aquatic Organisms**, v. 22, p- 59-65, 1995.

COLWELL R. R.; LISTON J. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 8, p. 104–109, 1960.

DANTAS-NETO M.P.; SABRY R.C.; FERREIRA L.P.; ROMÃO L.S.; MAGGIONI R. *Perkinsus sp.* infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* from estuaries of the septentrional Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v.75, p. 1030-1034, 2015.

DANG C.; TAN T.; MOFFIT D.; DEBOUTTEVILLE J. D.; BARNES A. C. Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, p. 138-142, 2012.

DANG C.; LAMBERT C.; SOUDANT P.; DELAMARE-DEBOUTTEVILLE J.; ZHANG M. M.; CHAN J.; et al. Immune parameters of QX-resistant and wild caught *Saccostrea glomerata*

hemocytes in relation to *Marteilia sydneyi* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, p. 1034-1040, 2011.

DA SILVA P. M.; BRANDAO R. P.; BOEHS G. ; SABRY R. C. ; CEUTA L. O. ; LUZ M. S. A.; QUEIROGA, F. R. . *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology** (Print). v. 112, p. 138-141, 2013.

DA SILVA P.M.; SCARDUA M.P.; VIANNA R.T.; MENDONÇA R.C.; VIEIRA C.B.; DUNGAN C. F.; SCOTT G. P.; REECE K. S. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio Sao Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, V. 19, p. 62–71, 2014.

DONAGHY L.; KRAFFE E.; LE GOÏC N.; LAMBERT C.; VOLETY A. K.; SOUDANT P. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement, **PLoS One** v.7, 2012.

DONAGHY L.; VOLETY A. K. Fish & Shell fish Immunology Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel , *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 808–814, 2011.

DONAGHY L. et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 296–301, 2009.

DUPERTHUY M.; BINESSE J.; LE ROUX F.; ROMESTAND B.; CARO A.; GOT P.; GIVAUDAN A.; MAZEL D.; BACHÈRE E.; DESTOUMIEUX-GARZÓN D. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 951-963, 2010.

EFSA AHAW PANEL. EFSA. Panel on Animal Health and Welfare: Scientific opinion on oyster mortality. **EFSA Journal** 2015, v. 13, n. 6, 2015.

ELLIS R. P. et al. Immunological function in marine invertebrates : Responses to environmental perturbation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 6, p. 1209–1222, 2011.

ENRÍQUEZ-ESPINOZA T. L.; GRIJALVA-CHON J. M.; CASTRO-LONGORIA R.; RAMOS-PAREDES J. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 89, p. 269–273, 2010.

ENGELMANN, P.; COOPER, E. L.; NÉMETH, P. Anticipating innate immunity without a Toll. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 8, p. 931–942, 2005.

EPAGRI. **Síntese Informativa da Maricultura 2015**. Florianópolis.

FAO. Fisheries and Aquaculture Department. **Fishery and Aquaculture 2016**.

FASSLER R. New developments in pearl farming. **World Aquaculture**, v. 26, p. 5-10, 1995.

FAWCETT D. W. Cytoplasmic inclusions. London, Toronto, W.B. Saunders Co. Philadelphia. **The Cell**. p. 641–741, 1981a.

FENG C. et al. The galectin CvGal1 from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) binds to blood group a oligosaccharides on the hemocyte surface. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 34, p. 24394–24409, 2013.

FISHER W. S.; OLIVER L. M.; EDWARDS P. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida Continental Shelf Research Journal, v. 15, p. 555-564, 1996.

FLEURY E.; HUVET A.; LELONG C.; DE LORGERIL J.; BOULO V.; GUEGUEN Y. et al. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the Gigas Database. **BioMed Central**, v. 10, p. 341, 2009.

FOLEY D. A.; CHENG T. C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and

Mercenaria mercenaria. Journal of Invertebrate Pathology, v. 25, p. 189-187, 1975.

GANZ T. *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 710–720, 2003.

GERVIS M. H.; SIMS N. A. The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia:Pteriidae). **ICLARM STU**, v. 21, p. 49, Havaí, 1992.

GOEDKEN, M.; DE GUISE, S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. **Fish & shellfish immunology**, v. 16, n. 4, p. 539–52, abr. 2004.

GÓMEZ-ROBLES, E. et al. Internal nutrient management associated with gonad quality and successful reproduction in the winged pearl oyster *Pteria sterna*. **Aquaculture**, v. 412-413, p. 45–51, nov. 2013.

GUANÍ-GUERRA E.; SANTOS-MENDOZA T.; LUGO-REYES S. O.; AND TERAN L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, p. 1–11, 2010.

GUEGUEN Y.; et al.. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 516–522, 2009.

GUEGUEN, Y. et al. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. **Gene**, v. 303, p. 139–145, 2003.

GUERTLER C. Defesa antiviral em *Litopenaeus vannamei* contra o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), induzida via RNA de interferência, e sua influência na expressão de alguns genes imunológicos, p. 103. **Dissertação de Mestrado em Aquicultura**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

GUIMARÃES-COSTA A. B.; et al. ETosis: a microbicidal mechanism beyond cell death, **Journal of Parasitology Research**, ID 929743, 11 p., 2012.

GULLIAN-KLANIAN M.; HERRERA-SILVEIRA J. A.; RODRÍGUEZ-CANUL R.; AGUIRRE-MACEDO L. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms** v. 79, p. 237–247, 2008.

GREEN, T. J.; BARNES, A. C. Inhibitor of REL/NF- κ B is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 260–265, 2009.

HANCOCK R. E.; SCOTT M. G. *The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97. v. 88, p. 56-61, 2000.

HARDY S. W.; FLETCHER, T. C.; OLAFSEN, J. A. Aspects of cellular and humoral defence mechanisms in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. In *Developmental Immunobiology*. (J. B. Solomon & J. D. Horton, eds) pp. 59–66. Amsterdam: **Elsevier/North Holland**, 1984.

HASZPRUNAR G. The molluscan rhogocyte (pore cell, Blasen-zelle, cellule nucale), and its significance for ideas on nephridial evolution. **Journal of Molluscan Studies**, v. 62, p. 185–211, 1996.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, n. 2, p. 249–265, set. 2003.

HÉGARET H., WIKFORS G.H.; SOUDANT P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p. 237–265, 2003a.

HÉGARET H., WIKFORS G.H., SOUDANT P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p. 237–248, 2003b.

HINE, P. . The inter-relationships of bivalve haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 5, p. 367–385, 1999.

HUBERT F.; NOEL T.; ROCH P. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Eur J Biochem**, v. 240, p. 302-306, 1996.

IBGE. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2013**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/monitoramento-e-controle/informacoes-e-estatisticas>>. Acesso em: 30 Mar 2016.

ITOH N. et al. Identification and characterization of multiple b -glucan binding proteins in the Pacific oyster , *Crassostrea gigas*. **Molecular Immunology** v. 34, p. 445–454, 2010.

ITOH N.; TAKAHASHI K. G. A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 8-9, p. 1768–1774, 2009.

JAUZEIN C.; DONAGHY L.; VOLETY A. K. Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray venus clam *Macrocallista nimbosa* and influence of salinity variation. **Fish and Shellfish Immunology**, v.35, p.716-24, 2013.

JEMAA, M. et al. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oyster. **The Journal of experimental biology**, p. 3067–3077, 2014.

JENNE C. N.; WONG C. H. Y. ; ZEMP F. J.; MCDONALD B.; RAHMAN M. M., FORSYTH P. A., et al., Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. **Cell Host Microbe**, v. 13, p. 169-180, 2013.

JONES T.O.; WHYTE J. N. C.; GINTHER , N.G.; TOWN- SEND L.D.; IWAMA G.K. Haemocyte changes in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, caused by exposure to domoic acid in the diatom *Pseudonitzschia pungens* F multiseres. **Toxicon** v. 33, p. 347-353, 1995.

KAZDA J.; PAVLIK I.; FALKINHAM J.O.; HRUSKA K. **The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health**. Berlin. Ed 1. Springer Netherland, 2009.

KINOTI G. K. Observations on the infection of bulinid snails with *Schistosoma mattheei*. II. The mechanism of resistance to infection. **Parasitology**, 62, 161-70, 1971.

KUCHEL R. P.; ALADAILEH S.; BIRCH D.; VELLA N.; RAFTOS D. A. Phagocytosis of the protozoan parasite, *Marteilia sydneyi*, by Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 104, p.97-104, 2010.

KUCHEL, R. P. et al. Haemocyte morphology and function in the Akoya pearl oyster, *Pinctada imbricata*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 105, n. 1, p. 36-48, set. 2010.

KUEH C. S. W.; CHAN K. Y. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 41-47, 1985.

KY, C.-L. et al. Influence of grafter skill and season on cultured pearl shape, circles and rejects in *Pinctada margaritifera* aquaculture in Mangareva lagoon. **Aquaculture**, v. 435, p. 361-370, jan. 2015.

LABREUCHE Y.; SOUDANT P.; GONCALVES M.; LAMBERT C.; AND NICOLAS J. L. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. Developmental and Comparative. **Immunology**, v. 30, p. 367-379, 2006b.

LAMBERT C.; SOUDANT P.; CHOQUET G.; PAILLARD C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. **Fish & shellfish immunology**, v. 15, p. 225-40, 2003.

LARSON, K. G.; ROBERSON, B. S.; HETRICK, F. M. Chemiluminescence of Hemocytes From the. v. 6, n. 1981, p. 131-136, 1989.

LE GALL, G.; BACHERE, E.; MIALHE, E. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms . **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 11, n. Roos 1980, p. 181-186, 1991.

LE ROUX, F. et al. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: Ecology, evolution and pathogenesis (Paris, 11-12 March 2015). **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUL, p. 1–8, 2015.

LI, S. et al. Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming. **Fish & shellfish immunology**, v. 45, n. 1, p. 194–202, jul. 2015.

LIE K. J.; HEYNEMAN, D.; LIM H. K. Studies on Resistance in Snails - Specific Resistance Induced by Irradiated Miracidia of *Echinostoma-Lindoense* in *Biomphalaria glabrata* Snails. **International journal for parasitology**, v. 5, n. 6, p. 627–631, 1975.

LIU S.; JIANG X.; HU X.; GONG J.; HWANG H.; MAI K. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two Scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 678-682, 2004.

LUZ M. S.; BOEHS G. *Perkinsus beihaiensis* infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* em cultivo e em estoque natural na Baía de Camamu, Bahia, Brasil. **Brazilian journal veterinary res. And animal science**. V. 53, p. 191, 2016.

MARTENOT C.; et al. Detection of undescribed ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) specimens from Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 182–189, nov. 2015.

MITTA G. et al. Mytilin B and MGD2 , two antimicrobial peptides of marine mussels : gene structure and expression analysis. v. 24, p. 381–393, 2000.

MITTA G. Involvement of Mytilins in Mussel Antimicrobial Defense. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 17, p. 12954–12962, 21 abr. 2000.

MOORE C. A.; EBLE A. F. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. **The Biological Bulletin**, v. 152, p. 105–119, 1977.

MOREAU P.; et al. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. **Autophagy**. v.11:3, p. 516-526, 2015.

MUTA T. Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1 → 3)-beta-D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern. **Current Pharmaceutical Design**, v. 32, p. 4155-4161, 2006.

NAGAI K. A history of the cultured pearl industry. **Zoological science**, v. 30, n. 10, p. 783–93, 2013.

NAGANUMA T. et al. Novel matrix proteins of pteria penguin pearl oyster shell nacre homologous to the jacalin-related β -prism fold lectins. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

NAGANUMA T. et al. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. **Molecular Diversity**, v. 10, n. 4, p. 607–618, 2006.

NAKAYAMA K.; NOMOTO A. M.; NISHIJIMA M.; MARUYAMA T. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 69, p.105–111, 1997.

NICOLAS J. L. et al. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, n. 1, p. 35–43, 2002.

OTTAVIANI E. Molluscan immunorecognition. **Invertebrate Survival Journal**, v. 3, p. 50-63, 2006.

OTTAVIANI E.; FRANCHINI A.; FRANCESCHI C. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. **Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications**.v. 195, p. 984-988, 1993.

OTTAVIANI E.; MALAGOLI D. Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 38, p. 56-64, 2014.

OUBELLA R.; MAES P.; BASSEM A.; PAILLARD C.; AUFFRET M. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). **Aquatic Living Resources**, v. 9, p. 137-143, 1996.

PAPAYANNOPOULOS V.; ZYCHLINSKY A. NETs: a new strategy for using old weapons, **Trends Immunology**, v.30, p. 513-521, 2009.

PASS D.; DYBDAHL R.; MANNION M. Investigations into the Causes of Mortality of the Pearl Oyster *Pinctada maxima* (Jameson), in Western Australia. **Aquaculture**, v. 65, p. 149–169, 1987.

PEDRO C. Marine microbial diversity : can it be determined ? v. 14, n. 6, 2006.

PIPE R. K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. **Histochemical Journal**, v. 22, p. 595–603, 1990.

PIPE, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 16, n. 2-3, p. 111–122, 1992.

PIPE R. K.; COLES J. A.; THOMAS M. E.; FOSSATO V. U.; PULSFORD A.L. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. **Aquatic Toxicology**.v. 32, p. 59-73, 1995.

PINHO, L. et al. Experimental Parasitology First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia : Veneridae) in Brazil. v. 150, p. 67–70, 2015.

PLAZZI F.; CEREGATO A.; TAVIANI M.; PASSAMONTI M. A molecular phylogeny of bivalve mollusks: ancient radiations and divergences as revealed by mitochondrial genes. **PLoS One**, v. 6, 2011.

POIRIER A. C.; *et al.*, Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. **Journal of Biological Chemistry**, v.289, p. 821-831, 2014.

PRADO-ALVAREZ M. et al. Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 1, p. 69–78, jan. 2012.

QUEIROGA F. R.; VIANNA R. T. ; VIEIRA C. B. ; FARIAS N. D. ; DA SILVA P. M. . Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology**, v. 142, p. 756-766, 2015.

REBELO, M. D. F. et al. New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57384, jan. 2013.

RENWRANTZ L.; STAHLER, A. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. **Journal of Comparative Physiology B**, 1983.

ROMALDE J. L. et al. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. January, p. 413, 2014.

ROSA R. D. et al. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25594, jan. 2011.

RACHFORD F. W. Host-parasite relationship of *Angiostrongylus cantonensis* in *Lymnaea palustris* 2. Histopathology. **Experimental Parasitology**, v. 36, p. 382-392, 1976.

RIOS E.C. **Compendium of Brazilian sea shells**. Ed. Evangraf, p. 668, Rio Grande, 2009.

ROSA R. D.; BARRACCO M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, p. 262-284, 2010.

RUSSELL-PINTO F.; REIMAO R.; DE SOUSA M. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, p. 383–397, 1994.

RUWANDEEPIKA H. A. D.; JAYAWEEERA P. S.; BHOWMICK P. P.; KURANAGASAR I.; BOSSIER P.; DEFROIDT T.; Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 59–74, 2012.

SABRY, R. C. et al. First report of *Perkinsus sp.* infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. **Inter Research Diases of aquatic organisms**, v. 88, p. 13–23, 2009.

SABRY R. C.; GESTEIRA T. C. V.; MAGALHAES A. R. M.; BARRACCO M.A.; GUERTLER C.; FERREIRA L. P.; FERREIRA L. P.; VIANNA R. T.; DA SILVA P. M. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceara State, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 24-32, 2013.

SABRY, R. C.; ROSA, R. D.; MAGALHÃES, A. R. M.; BARRACCO M. A.; GESTEIRA, T. C. V.; DA SILVA, P. M.. First report of *Perkinsus sp.* infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, p. 13–23, 2009.

SAULNIER D.; DE DECKER S.; HAFFNER P.; COBRET, L.; ROBERT M.; GARCIA, C. A large- scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. **Microbial Ecology**, v. 59, p. 787–798, 2010.

SAWABE, T. et al. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. DEC, p. 1–14, 2013.

SCHLEDER, D. D. et al. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 256–263, ago. 2008.

SCHMITT, P. et al. Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 37, n. 3-4, p. 363–370, 2012.

SCHMITT P.; MONTAGNANI C.; BACHÈRE E.; DESTOUMIEUX-GARZÓN D. Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: An overview with focus on summer mortalities. **Nova Science Publishers**, c. 9, 2011.

SILVA P. M.; et al. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 96-103, 2013.

SONG, X. et al. An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 2, p. 326–332, 2010.

SOUDANT, P.; E CHU, F.-L.; VOLETY, A. Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. **Journal of invertebrate pathology**, v. 114, n. 2, p. 196–216, 2013.

SMOLOWITZ R. M.; MIOSKY D.; REINISCH, C. L. Ontogeny of leukemic cells of the soft shell clam. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 41–51, 1989.

SULLIVAN J. T. Hematopoiesis in three species of gastropods following infection with *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 107, p. 355-361, 1988.

SUN J. C.; UGOLINI S.; VIVIER E. Immunological memory within the innate immune system. **The EMBO journal**, v. 33, n. 12, p. 1295–303, 17 jun. 2014.

SUN J.; WU X.; ZHANG W. Morphological, structural and functional characteristics of the hemocytes of the oyster, *Crassostrea ariakensis*. **Journal of Shellfish Research**, v. 25, p. 55–64, 2006.

SPURR A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, p. 31-43, 1969.

SUTTLE C. A. Marine viruses--major players in the global ecosystem. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 801–812, 2007.

SUTTON D. C.; GARRICK R. Bacterial Disease of Cultured Giant Clam *Tridacna gigas* Larvae. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 16, p. 47–53, 1993.

TANGUY A.; GUO X.; FORD S. E. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. **Gene**, v. 338, n. 1, p. 121–131, 2004.

TASUMI S.; VASTA G.R. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. **The Journal of Immunology**, v.179, p. 3087-3097, 2007.

TERAHARA K.; TAKAHASHI K., Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. **Current Pharmaceutical Design** v. 14, p. 131–137, 2008.

THOMPSON F. L.; IIDA T.; SWINGS J. Biodiversity of Vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p.403–431, 2004.

TIRAPE A.; BACQUE C.; BRIZARD R.; VANDENBULCKE F.; BOULO V. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. **Developmental & Comparative Immunology**, 31, p. 859-873, 2007.

TORRREILLES, J.; M. C. GUÉRIN. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes *in vitro*. **Fish & shellfish immunology** v. 9, p. 509-518, 1999.

TRAVERS M.-A. et al. Bacterial diseases in marine bivalves. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 11–31, 2015.

URBAN H. J. Culture potential of the pearl oyster (*Pinctada imbricata*) from the Caribbean. II. Spat collection, and growth and mortality in culture systems. **Aquaculture**, v. 189, n. 3-4, p. 375–388, 2000.

VARGAS-ALBORES F.; BARRACCO M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. In: Maeda-Martínez, A.N. (Ed), **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. Limusa, La Paz, p.127-14, 2001.

VASTA G.; CHENG, T.; MARCHALONIS J. A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). **Cell Immunology**, v. 88, p. 475–488, 1984.

VASTA G.; SULLIVAN J.; CHENG T.; MARCHALONIS J.; WARR G. A cell membrane- associated lectin of the oyster hemocyte. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 40, p. 367–377, 1982.

VIEIRA G. C. Caracterização preliminar dos hemócitos da perllífera nativa *Pteria hirundo* **Trabalho de Conclusão de Curso**. Engenharia de Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

VILLALBA A.; GESTAL C.; CASAS S. M.; FIGUERAS A. Perkinsosis en moluscos. In: Figueras A, Novoa B. Enfermedades de moluscos bilvalvos de interés en acuicultura. **Fundación Observatorio Español de Acuicultura**, p. 181-242. Madrid, 2011.

VILLALBA, A. et al. Perkinsosis in molluscs : A review. v. 432, p. 411–432, 2004.

WANG J.; WANG L.; YANG C.; JIANG Q.; ZHANG H.; YUE F.; HUANG M.; SUN Z.; SONG L. The response of mRNA expression upon secondary challenge with *Vibrio anguillarum* suggests the involvement of C-lectins in the immune priming of scallop *Chlamys farreri*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 40, p. 142–147, 2013.

WANG Y.; HU M.; CHIANG M.W.L.; Shin P.K.S.; Cheung S.G. Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*. **Fish & shellfish immunology**, v. 32, p. 381–90, 2012.

WANG D.; et al. Genome sequencing reveals unique mutations in characteristic metabolic pathways and the transfer of virulence genes between *V. mimicus* and *V. cholerae*. **PLoS One**, v. 6, e21299, 2011.

WANG L.; SONG L.; ZHAO J.; QIU L.; ZHANG H.; WEI X. et al. Expressed sequence tags from the zhikong scallop (*Chlamys farreri*): Discovery and annotation of host defense genes. **Fish & Shellfish Immunol** v. 26, p. 744-750, 2009.

WASSNIG M.; SOUTHGATE P. C. Effects of settlement cues on behaviour and substrate attachment of hatchery reared winged pearl oyster (*Pteria penguin*) larvae. **Aquaculture**, v. 344-349, p. 216–222, maio 2012.

WEN C. M.; KOU G. H.; CHEN S. N. Light and electron microscopy of hemocyte of the hard clam, *Meretrix lusoria* (Röding). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 108A, p. 279–286, 1994.

WOOTTON E. C.; PIPE R. K. Structural and functional characterization of the blood cells of the bivalve mollusk, *Scrobicularia plana*. **Fish & shellfish immunology**, v. 15, p. 249–262, 2003.

YAMAURA K.; TAKAHASHI K. G.; SUZUKI T. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 149, n. 1, p. 168–75, 2008.

YOUNT N.Y.; BAYER A.S.; XIONG Y.Q.; YEAMAN M.R. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. **Biopolymers**, v. 84, p. 435–458, 2006.

ZHANG T.; QIU L.; SUN Z.; WANG L.; ZHOU Z.; LIU R.; YUE F.; SUN R.; SONG L. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 45, p. 141–150, 2014.

ZHANG D. et al. A multidomain galectin involved in innate immune response of pearl oyster *Pinctada fucata*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 1, p. 1–6, 2011.

ZAROOGIAN G.; YEVICH P. Cytology and biochemistry of brown cells in *Crassostrea virginica* collected at clean and contaminated stations. **Environmental Pollution**, v. 79, p. 191–197, 1993.